(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-530146
(P2012-530146A)
(43)公表日　平成24年11月29日(2012.11.29)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 39/155	***(2006.01)***	A61K	39/155	4C076
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	4C084
A61P 37/04	***(2006.01)***	A61P	37/04	4C085
A61P 11/00	***(2006.01)***	A61P	11/00	
A61K 9/107	***(2006.01)***	A61K	9/107	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）

(21)出願番号　特願2012-516271 (P2012-516271)
(86)(22)出願日　平成22年6月16日 (2010.6.16)
(85)翻訳文提出日　平成24年2月16日 (2012.2.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/038854
(87)国際公開番号　WO2010/148111
(87)国際公開日　平成22年12月23日 (2010.12.23)
(31)優先権主張番号　61/187,529
(32)優先日　平成21年6月16日 (2009.6.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　506277410
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　ミシガン
アメリカ合衆国　ミシガン州　４８１０４－２５９４　アナーバー　サウス　ステイト　ストリート　１２１４　セカンド　フロア　オフィス　オブ　テクノロジー　トランスファー
(74)代理人　110000338
特許業務法人原謙三国際特許事務所
(72)発明者　ルカーチ，ニコラス　ダブリュー．
アメリカ合衆国，４８１１６　ミシガン州，ブライトン，ソリチュード　ドライブ　８８８４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ナノエマルションワクチン

(57)【要約】
本発明は免疫応答を刺激する方法および組成物を提供する。本発明は、パラミクソウイルス科に属する病原性ウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する免疫応答（例えば、免疫（例えば防御免疫））を誘導するための、免疫原性のナノエマルション組成物、およびこれを用いた方法を特に提供する。本発明の組成物および方法には、なかでも臨床用途（例えば、治療薬および予防薬（例えばワクチン接種））および研究用途が見出されている。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ナノエマルションによって不活性化されている呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）を含んでいる、免疫原性組成物。
【請求項２】
上記ナノエマルションは、Ｗ$_{80}$５ＥＣである、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
１～５０％のナノエマルション溶液を含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項４】
５～１５％のナノエマルション溶液を含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項５】
１５％のナノエマルション溶液を含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項６】
10^4 ＰＦＵの不活性化されている呼吸器合胞体ウイルスを含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項７】
熱安定性である、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項８】
薬学的に受容可能な担体をさらに含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項９】
免疫賦活剤をさらに含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項１０】
上記免疫賦活剤がＴｈ１型の免疫応答に進ませる、請求項９に記載の免疫原性組成物。
【請求項１１】
呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）に対する、対象における免疫応答の誘導の方法であって、
（ａ）ナノエマルション、および当該ナノエマルションによって不活性化されている免疫原を含んでいる免疫原性組成物を準備すること；ならびに
（ｂ）上記対象がＲＳＶに対する免疫応答を生じるような条件の下に上記組成物を上記対象に投与することを包含している、方法。
【請求項１２】
上記投与することは、上記対象の粘膜表面に上記組成物を接触させることを包含している、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
上記粘膜表面は鼻粘膜を包含している、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
免疫応答の上記誘導は上記対象における上記ＲＳＶに対する免疫を誘導する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
上記免疫は全身性免疫を包含している、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
上記免疫は粘膜免疫を包含している、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
上記免疫応答は、上記対象におけるＩＦＮ－γの増大した発現を包含している、請求項１１に記載の方法。
【請求項１８】
上記免疫応答は、上記対象におけるＩＬ－１７の増大した発現を包含している、請求項１１に記載の方法。
【請求項１９】
上記免疫応答は、ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３の増大した発現の非存在を包含

している、請求項１１に記載の方法。
【請求項２０】
上記免疫応答は、不活性化されている上記ＲＳＶに対する全身性のＩｇＧ応答を包含している、請求項１１に記載の方法。
【請求項２１】
上記ナノエマルションによって不活性化されている上記ＲＳＶは、１０～１０^{3}ｐｆｕの不活性化されている上記ＲＳＶが上記対象に対して投与される投与量として存在している条件の下に、上記対象に対して投与される、請求項１１に記載の方法。
【請求項２２】
１５％のナノエマルションが上記ＲＳＶの不活性化に使用される、請求項１１に記載の方法。
【請求項２３】
上記ナノエマルションがＷ$_{80}$５ＥＣを含んでいる、請求項１１に記載の方法。
【請求項２４】
上記免疫は、ＲＳＶによって引き起こされる疾患の徴候または症状を示すことから上記対象を保護する、請求項１１に記載の方法。
【請求項２５】
上記免疫は、生きたＲＳＶに対する、後に起こるばくろをともなう攻撃から上記対象を保護する、請求項１１に記載の方法。
【請求項２６】
上記組成物が免疫賦活剤をさらに含んでいる、請求項１１に記載の方法。
【請求項２７】
上記対象はヒトである、請求項１１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本出願は、その全体が参照によって本明細書全体に援用される、米国仮出願第６１／１８７，５２９号（出願日：２００９年６月１６日）に対する優先権を主張する。
【０００２】
〔技術分野〕
本発明は免疫応答を刺激する方法および組成物を提供する。本発明はパラミクソウイルス科に属する病原性ウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する免疫応答（例えば、免疫（例えば防御免疫））を誘導するための、免疫原性組成物、およびこれを用いた方法を特に提供する。本発明の組成物および方法には、なかでも臨床用途（例えば、治療薬および予防薬（例えばワクチン接種））および研究用途について見出されている。
【０００３】
〔背景技術〕
免疫化は、人々の健康を向上させるための重要な機序である。多くの一般的な病気に対して功を奏する種々のワクチンを利用可能であるにもかかわらず、感染症は依然として保健の問題および死亡の主因である。既存のワクチンに固有の重要な問題は、反復した免疫化の必要、および広範な疾患に対する既存のワクチン送達系の非効率性を包含している。
【０００４】
ワクチンが未開発な病原体に対するワクチンを開発するためにか、および／または市販のワクチンの欠点（例えば、有害作用、高コスト、複雑性および／または不十分な活用性に起因する）を克服するためには、ワクチンに関するより低頻度の免疫化、より効率的な使用法、および／またはより小さい副作用を可能にする抗原提示の新たな方法を開発する必要がある。
【０００５】

〔発明の概要〕

本発明は、免疫応答の刺激のための方法および組成物を提供する。本発明は、パラミクソウイルス科に属する病原性ウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する免疫応答（例えば、免疫（例えば、防御免疫））を誘導するための免疫原性組成物およびそれを用いた方法を特に提供する。本発明の組成物および方法は、とりわけ臨床医学（例えば、治療薬および予防薬（例えば、ワクチン））および研究への応用における用途について見出されている。

【０００６】

いくつかの実施形態において、本発明は、不活性化されている免疫原のマイクロエマルションを含んでいる免疫原性組成物を提供する。当該免疫原は、例えばパラミクソウイルス科に属する病原性ウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））である。上記マイクロエマルションは、水相、油相および溶媒を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原はパラミクソウイルス科に属している病原性ウイルス（例えば、例えば本発明のエマルションを用いてか、または他の方法によって、不活性化されているＲＳＶ）を含んでいる。いくつかの実施形態において、ＲＮＡウイルスは、パラミクソウイルス科に属するウイルスである。例えば、いくつかの実施形態において、上記ウイルスはパラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ニューモウイルス亜科のウイルスである。好ましい実施形態において、上記ウイルスは呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）である。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、不活性化されているＲＳＶのナノエマルションを含んでいる。いくつかの実施形態において、上記ナノエマルションは、W_{80}５ＥＣであるが、本発明はこれに限定されない。例えば、いくつかの実施形態において、上記ナノエマルションは、本明細書に記載のナノエマルション組成物の１つから選択される。いくつかの実施形態において、上記組成物は、１～５０％のナノエマルション溶液を含んでいるが、より多い量およびより少ない量が本発明において使用されることが分かっている。例えば、いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約１．０％～約１０％、約１０％～２０％、約２０％～３０％の、約３０％～４０％、約４０％～５０％、約５０％～６０％のまたはそれを超えるナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約１０％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約１５％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約２０％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約１２％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約８％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約５％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約２％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、約１％のナノエマルション溶液を含んでいる。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物（例えば、対象において免疫応答を生じさせるために対象に投与される）は、パラミクソウイルス科に属する不活性化されている病原性ウイルス（例えばＲＳＶ）の約２×１０^{6}プラーク形成ユニット（ＰＦＵ）を含んでいるが、より多い量（例えば、約４×１０^{6}ＰＦＵ、８×１０^{6}ＰＦＵ、１×１０^{7}ＰＦＵ、２×１０^{7}ＰＦＵ、４×１０^{7}ＰＦＵ、８×１０^{7}ＰＦＵ、１×１０^{8}ＰＦＵ、１×１０^{9}ＰＦＵ、またはそれを超える、ナノエマルションによって不活性化されているＲＳＶ）、およびより少ない量（例えば、約１×１０^{6}ＰＦＵ、５×１０^{5}ＰＦＵ、１×１０^{5}ＰＦＵ、５×１０^{4}ＰＦＵ、１×１０^{4}ＰＦＵ、５×１０^{3}ＰＦＵ、１×１０^{3}ＰＦＵ、またはそれを下回る、ナノエマルショ

ンによって不活性化されているパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ））を使用し得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、（例えば、室温において（例えば、１２時間、１日間２日間、３日間、４日間、１週間、２週間、３週間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、４ヶ月間、５ヶ月間、６ヶ月間、９ヶ月間、１年間またはそれ以上にわたって）安定である。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、薬学的に受容可能な担体を含んでいる。本発明は、薬学的に受容可能な、任意の特定の担体に限定されない。実際に、任意の好適な担体（本明細書に記載の担体が挙げられるが、これらに限定されない）が使用され得る。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物は、免疫賦活剤をさらに含んでいる。本発明は任意の特定の免疫賦活剤に限定されず、本明細書に記載の１つ以上の任意の免疫賦活剤（Ｔｈ１免疫応答に進ませる免疫賦活剤が挙げられるが、これに限定されない）は、本発明の組成物に使用され得ることが分かっている。いくつかの実施形態において、上記免疫原は病原体産物（例えば、病原体に由来するタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、多糖または膜の構成成分が挙げられるが、これらに限定されない）を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫原およびナノエマルションは、単一の容器において組み合わせられている。

【０００７】

いくつかの実施形態において、本発明は、パラミクソウイルス科の病原体ウイルス（例えば、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ））に対する、対象における免疫応答を誘導する方法を提供する。当該方法は、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる免疫原性組成物を準備すること、ならびに上記対象が上記ウイルスに対する免疫応答を生じる条件のもとに、上記組成物を上記対象に投与することを包含している。ここで、上記免疫原は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））を包含している。本発明は、本発明の組成物の投与のために選択される経路によって限定されない。いくつかの実施形態において、上記免疫原性組成物を投与することは、上記対象の粘膜表面に上記組成物を接触させることを包含している。いくつかの実施形態において、免疫応答を誘導することは、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）に対する、上記対象における免疫を誘導する。いくつかの実施形態において、上記免疫は全身性免疫を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫は粘膜免疫を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫応答は上記対象におけるＩＦＮ－γの増大した発現を包含している。いくつかの実施形態において、上記対象におけるＩＬ－１７の増大した発現を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫応答はＴｈ２型サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３）の増大した発現の非存在を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫応答はパラミクソウイルス科に属する不活性化されているウイルス（例えばＲＳＶ）に対する全身性のＩｇＧ応答を包含している。いくつかの実施形態において、上記ナノエマルションによって不活性化されているパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）は、不活性化されているウイルスの１０～10^3プラーク形成ユニット（ＰＦＵ）が上記対象に投与される単回投与量に存在している条件のもとに上記対象に投与される。しかし、ナノエマルションによって不活性化されているパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）のより多いＰＦＵ（例えば、約10^4、10^5、10^6、10^7、10^8またはそれを超える）が使用され得る。いくつかの実施形態において、１５％のナノエマルション溶液が上記ウイルスを不活性化させるために使用される。いくつかの実施形態において、上記ナノエマルションは、W_{80}５ＥＣを含んでいる。いくつかの実施形態において、上記免疫は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）によって引き起こされる疾患の徴候または症状を示すことから上記対象を保護する。いくつかの実施形態において、上記免疫は、パラミクソウイルス科に属する生きたウイルス（例えばＲＳＶ）に対する、後に起こるばくろをともなった攻撃から上記対象を保護する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、免疫賦活剤をさらに含んでいる。いくつかの実施形態において、上記対象はヒトである。

【０００８】
いくつかの実施形態において、免疫応答を誘導することは、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する、上記対象における免疫を誘導する。いくつかの実施形態において、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）に対する免疫を誘導することは全身性免疫を包含している。いくつかの実施形態において、免疫は粘膜免疫を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫応答は上記対象におけるＩＦＮ－γの増大した発現を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫応答は、対象における、ＩＬ－１７または他の種類のＴｈ１サイトカインの増大した発現を包含している。いくつかの実施形態において、上記免疫手応答は上記免疫原に対する粘膜のＩｇＡ応答を包含している。いくつかの実施形態において、各単回投与量は、上記ウイルスに対する免疫応答を生じさせるために十分な量の、ナノエマルションによって不活性化されているパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）を含んでいる。パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の有効量は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の量が、対象に投与されたときに、当該対象における免疫応答を生じさせる限り、定量化される必要のない量である。いくつかの実施形態において、本発明のナノエマルションが使用されて、パラミクソウイルス科に属する生きたウイルス（例えばＲＳＶ）を不活性化させるとき、例えば免疫を誘導するために対象に投与される、各単回投与量が単回投与量につき１０～10^{10}ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{5}～10^{8}ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{3}～10^{5}ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{2}～10^{4}ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき１０ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{2}ｐｆｕのウイルスを含んでいること；いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{4}ｐｆｕのウイルスを含んでいることが期待される。いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{5}～10^{8}ｐｆｕを超えるウイルスを含んでいる。いくつかの実施形態において、各単回投与量が単回投与量につき10^{3}ｐｆｕのウイルスを含んでいる。

【０００９】
本発明は、任意の特定のナノエマルションの組成に限定されない。実際に、本発明における使用について見出されている種々のナノエマルションの組成が本明細書に記載されている。同様に、本発明は、ナノエマルションにおける特定の油の比率に限定されない。種々の油が意図されており、当該油としてはダイズ、アボカド、スクアレン、オリーブ、キャノーラ、トウモロコシ、アブラナ、ベニバナ、魚、フレーバ、および水に不溶性のビタミンが挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明は特定の溶媒に限定されない。種々の溶媒が意図されており、当該溶媒としては、アルコール（例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、およびオクタノールが挙げられるが、これらに限定されない）、グリセロール、ポリエチレングリコール、および有機リンに基づく溶媒が挙げられるが、これらに限定されない。ナノエマルションの成分（油および溶媒などが挙げられる）のさらなる詳細について以下に記載されている。

【００１０】
いくつかの実施形態において、エマルションは、界面活性剤をさらに含んでいる。本発明は特定の界面活性剤に限定されない。種々の界面活性剤が意図されており、当該界面活性剤としては、非イオン性およびイオン性の界面活性剤（例えば、TRITON X-100；TWEEN 20およびTYLOXAPOL）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００１１】
ある実施形態において、エマルションは、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物を

さらに含んでいる。本発明は、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物の特定のものに限定されない。ハロゲンを含んでいるカチオン性の種々の化合物が考慮さえており、当該化合物としては、セチルピリジニウムのハロゲン化物、セチルトリメチルアンモニウムのハロゲン化物、セチルジメチルエチルアンモニウムのハロゲン化物、セチルジメチルベンジルアンモニウムのハロゲン化物、セチルトリブチルホスホニウムのハロゲン化物、ドデシルトリメチルアンモニウムのハロゲン化物、およびテトラデシルトリメチルアンモニウムのハロゲン化物が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明は特定のハロゲン化物に限定されない。種々のハロゲン化物が意図されており、当該ハロゲン化物としては、塩化物、フッ化物、臭化物およびヨウ化物からなる群から選択されるハロゲン化物が挙げられるが、これらに限定されない。

【００１２】

さらなる実施形態において、エマルションは、第四級アンモニウムを含んでいる化合物をさらに含んでいる。本発明は、第四級アンモニウムを含んでいる化合物の特定のものに限定されない。第四級アンモニウムを含んでいる種々の化合物が意図されており、当該化合物としては、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウムおよび塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウムが挙げられるが、これに限定されない。

【００１３】

いくつかの実施形態において、本発明は免疫原性組成物を含んでいるワクチンを提供する。当該免疫原性組成物は、ナノエマルションによって不活性化されている、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）を含んでいる。いくつかの実施形態において、本発明はワクチンを含んでいるキットを提供する。当該ワクチンはエマルションおよび免疫原性組成物を含んでおり、ここで、当該免疫原性組成物は、ナノエマルションによって不活性化されている、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）を含んでおり、当該エマルションは、水相、油相および溶媒を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記キットは、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）に対して、対象をワクチン接種するキットを使用するための取扱説明書をさらに含んでいる。

【００１４】

さらなる実施形態において、本発明は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の１つ以上に対する免疫を誘導する方法を提供する。当該方法は、水相、油相および溶媒を含んでいるエマルション、ならびにパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の１つ以上を準備することと；パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の１つ以上を上記エマルションと組み合わせて、ワクチン組成物を生成することと；上記ワクチン組成物を対象に投与することとを包含している。いくつかの実施形態において、投与することは、上記対象の粘膜表面に上記ワクチン組成物を接触させることを包含している。例えば、いくつかの実施形態において、投与することは、鼻腔内投与を包含している。いくつかの好ましい実施形態において、投与することは、例えば１つ以上の免疫原に対する体液性免疫を起こすことによって、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の１つ以上に対する免疫を対象が生じる条件のもとに実施される。

【００１５】

本発明は、（例えば、ナノエマルションによって不活性化されている、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）を含んでいる免疫原性組成物の投与の後に）生じる免疫応答の性質によって限定されない。実際に、本発明のナノエマルションによって不活性化されている、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）およびナノエマルションを含んでいる組成物の投与を受けた対象において、種々の免疫応答が引き起こされ得、測定され得る。当該免疫応答としては、免疫系細胞（例えば、Ｂ細胞、Ｔ細胞、樹状細胞、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、マクロファージ、ナチュラルキラー（ＮＫ）細

胞など）の活性化、増殖または分化；マーカーおよびサイトカインの発現の上方制御または下方制御；ＩｇＡ力価、ＩｇＭ力価および／またはＩｇＧ力価の刺激；脾腫（例えば、増大した脾臓の細胞質）；過形成、種々の器官における混合性の細胞浸潤物、および／または公知の免疫刺激に関して評価され得る免疫系の（例えば細胞の）他の応答が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、投与することは、対象の粘膜表面を上記組成物と接触させることを包含している。本発明は接触させる粘膜表面によって限定されない。いくつかの好ましい実施形態において、粘膜表面は鼻粘膜を包含している。いくつかの実施形態において、粘膜表面は膣粘膜を包含している。いくつかの実施形態において、投与することは非経口投与を包含している。本発明は、本発明の組成物の投与のために選択される経路によって限定されない。いくつかの実施形態において、免疫応答を誘導することは、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の１つ以上に対する、対象における免疫を誘導する。いくつかの実施形態において、免疫は全身性免疫を包含している。いくつかの実施形態において、免疫は粘膜免疫を包含している。いくつかの実施形態において、免疫応答は、対象におけるＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－１７の増大した発現を包含している。いくつかの実施形態において、免疫応答は全身性のＩｇＧ応答を包含している。いくつかの実施形態において、免疫応答は粘膜のＩｇＡ応答を包含している。いくつかの実施形態において、組成物は、１５％のナノエマルション溶液を含んでいる。しかし、本発明はナノエマルションのこの量（例えば百分率）に限定されない。例えば、いくつかの実施形態において、組成物は、１０％の未満（例えば、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％）のナノエマルションを含んでいる。いくつかの実施形態において、組成物は、１０％を超える（例えば、１２％、２０％、２５％、３０％、４０％、４５％、５０％、６０％またはそれ以上）ナノエマルションを含んでいる。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、本明細書に記載のナノエマルションのうち任意のものを含んでいる。いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、W_{20}５ＥＣを含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、ナノエマルションは、W_{80}５ＥＣを含んでいる。いくつかの実施形態において、免疫はパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）によって引き起こされる疾患の徴候または症状を示すことから、対象を保護する。

【００１６】

いくつかの実施形態において、免疫は、パラミクソウイルス科に属する生きたウイルス（例えばＲＳＶ）に対する、後に起こるばくろをともなった攻撃から対象を保護する。いくつかの実施形態において、組成物は、免疫賦活剤をさらに含んでいる。本発明は使用される免疫賦活剤の種類によって限定されない。いくつかの実施形態において、免疫賦活剤はＣｐＧオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、免疫賦活剤はモノホスホリルリピドＡである。本発明における使用について見出されている他の免疫賦活剤の多くが本明細書に記載されている。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、免疫は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）の感染の徴候または症状を示すことから、対象を保護する。いくつかの実施形態において、免疫は、パラミクソウイルスに属するウイルス（例えばＲＳＶ）に対する１回以上のばくろによる感染の危険率を低減させる。

【００１７】

〔図面の説明〕

以下の図は、本明細書の一部を構成し、本発明のある局面および実施形態をさらに説明するために組み込まれている。本発明は、本明細書に示した特定の実施形態の記載と組み合わせてこれらの図面の１つ以上を参照することによって、より良く理解され得る。

【００１８】

図１は、ナノエマルションによる呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）の死滅を示す。

【００１９】

図２は、ナノエマルションによって不活性化されているＲＳＶ（ＮＥ－ＲＳＶ）による免疫化後のＲＳＶ特異的な抗体の誘導を示す。

【００２０】
図３は、対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、ＲＳＶ特異的なＣＤ８Ｔ細胞反応の促進をもたらすことを示す。
【００２１】
図４は、対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、ＲＳＶを抗原投与したマウスの気道からのＢＡＬ液における抗ウイルス性のサイトカインを促進することを示す。
【００２２】
図５は、ＮＥ－ＲＳＶによるマウスのワクチン接種が、生きたＲＳＶの抗原投与後に肺におけるＩＬ－１７の産生を促進することを示す。
【００２３】
図６は、対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、当該投与の後における生きたウイルスの抗原投与において、排除を向上させ、防御応答を誘導することを示す。
【００２４】
図７は、対照のマウスと比較した、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおける種々の遺伝子の発現を示す。
【００２５】
図８は、対照のマウスと比較した、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおける肺組織切片の過ヨウ素酸シッフ（ＰＡＳ）染色を示す。
【００２６】
図９は、対照のマウス対する、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおけるサイトカインの発現を示す。
【００２７】
図１０は、顕しいＲＳＶ特異的な抗体反応がＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種後に全身に生じたこと（Ａ）、および生きたウイルスの抗原投与から２日後における、ワクチン接種したマウスの気管支肺胞洗浄液における総Ｉｇを示す。
【００２８】
〔発明の概略的な説明〕
本発明は、免疫応答の刺激のための方法および組成物を提供する。本発明は、パラミクソウイルス科に属する病原性ウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する免疫応答（例えば、免疫（例えば防御免疫））を誘導するための免疫原性組成物およびそれを用いた方法を特に提供する。本発明の組成物および方法には、なかでも臨床用途（例えば、治療薬および予防薬（例えばワクチン接種））および研究用途について見出されている。
【００２９】
機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、本発明のＮＥを用いたＮＥ処理（例えば、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））の中和）が、エマルションの油と水との境界面において、ウイルスの主要な抗原性エピトープ（例えば、対象の免疫系によって認識可能）の親水性および疎水性の成分を安定化させて（例えば、それによって対象が免疫応答を行い得る１つ以上の免疫原（例えば、安定化された抗原）を提供する）、当該エピトープを保持する（例えば、一方でウイルスの感染力を同時に中和および／または根絶する）。他の実施形態において、ＮＥ調合物は細孔を通して粘膜を通り抜けるため、樹状細胞の粘膜下の場所に免疫原を運び得る（例えば、それによって免疫応答を惹起および／または刺激する）。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、ＮＥおよびパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（

例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））を組み合わせることは、ウイルス性の免疫原を安定化させ、免疫応答の生起に適切な免疫原性因子を提供する。

【００３０】

樹状細胞はナノエマルション（ＮＥ）の油滴を貪食し、これが、抗原提示のためのウイルス性の免疫原（例えば、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））をナノエマルションによって不活性化した後に産生される抗原タンパク質またはそのペプチド断片）を吸収する手段をもたらし得る。他のワクチンは免疫賦活活性のために炎症性の毒素または他の免疫刺激に依存している（例えば、Holmgren and Czerkinsky, Nature Med. 2005, 11; 45-53を参照）が、ＮＥは動物研究およびヒトにおいて皮膚または粘膜上に載せたときに、炎症性であるとは示されていない。したがって、機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、本発明のＮＥを含んでいる組成物（例えば、ＮＥおよび１つ以上のパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））を含んでいる組成物）は、免疫系に対して「物理的な」免疫賦活剤（例えば、免疫原性組成物（例えば、パラミクソウイルス科に属するウイルスのペプチドおよび／または抗原）を輸送および／または提示する）として作用し得る。いくつかの実施形態において、本発明の組成物の粘膜投与は、全身性免疫と同様に粘膜免疫（例えば、粘膜免疫の徴候（例えば、ＩｇＡ抗体力価の発生））を発生させる。

【００３１】

細胞性免疫および体液性免疫の両方が、複数の病原体に対する免疫防御に関与し、そのいずれもが本発明のＮＥ調合物によって誘導され得る。いくつかの実施形態において、本発明の組成物（例えば、ニューモウイルス亜科のウイルス（例えばＲＳＶ）のＮＥによる不活性化）の、対象に対する投与（例えば、粘膜投与）は、体液性（例えば、特異的抗体の発達）および細胞性（例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球）の両方の免疫応答（例えば、ニューモウイルス亜科のウイルス（例えばＲＳＶ）に対する）をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明の組成物（例えば、ＮＥによって不活性化されているニューモウイルス亜科のウイルス（例えばＲＳＶ））は、ワクチン（例えば、ＲＳＶワクチン）として用いられる。

【００３２】

さらに、いくつかの実施形態において、本発明の組成物（例えば、ＮＥおよびパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））を含んでいる組成物）は、（例えば、対象に投与された際に）全身性免疫および粘膜免疫の両方を誘導する。したがって、いくつかの実施形態において、対象に対する本発明の組成物の投与は、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対するばくろ（例えば、粘膜に対する致死的なばくろ）に対する防御をもたらす。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、粘膜投与（例えばワクチン接種）は、ウイルス感染（例えば、粘膜表面において始まる）に対する防御を提供する。および粘膜表面に侵入する病原体に対する防御、および分泌性ＩｇＡ応答を刺激することは困難であるとこれまでに証明されている（例えば、Mestecky et al, Mucosal Immunology. 3ed edn. (Academic Press, San Diego, 2005)を参照）が、本発明は、

パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））に対する粘膜免疫（例えば、防御的なＩｇＡ応答）を刺激するための組成物および方法を提供する。

【００３３】

〔定義〕

本発明の理解を容易にするために、多くの用語および語句を以下に定義する。

【００３４】

本明細書に使用されるとき、「微生物」という用語は、微生物（真正細菌、ウイルス、古細菌、真菌、原生動物、マイコプラズマ、プリオン、および寄生生物が挙げられるが、これらに限定されない）の任意の種または型を指す。微生物という用語は、それ自身が他の生物（例えば、ヒトを包含する動物および植物）に対して病原性を有している生物、ならびにその生物自身は他の生物に対して直接的に病原性または感染性を有していないが他の生物に対して病原性の因子を産生する生物の両方を包含する。

【００３５】

本明細書に使用されるとき、「病原体」という用語および文法的に等価な用語は、他の生物に直接感染することによってか、または他の生物において疾患の原因となる因子を産生することによって、当該他の生物（例えば、動物および植物）において、疾患の状態（例えば、感染、病的状態、疾患など）を引き起こす、微生物を包含する生物（例えば、生物学的病原体）（例えば、病原性毒素などを産生する真正細菌）を指す。「病原体」としては、ウイルス、真正細菌、古細菌、真菌、原生動物、マイコプラズマ、プリオン、および寄生生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３６】

「真正細菌」という用語は、すべての原核生物（原生生物界におけるすべての系統内の生物が挙げられる）を指す。この用語は、マイコプラズマ、クラミジア、アクチノマイセス、ストレプトマイセス、およびリケッチアを包含する真正細菌であるとみなされるすべて微生物を包含する用語であると意図されている。真正細菌のすべての形態（球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラストなどが挙げられる）がこの定義に中に包含される。

【００３７】

本明細書に使用されるとき、「真菌」という用語は、真核生物（例えば、糸状菌および酵母（二形性真菌が挙げられる））への言及において使用される。

【００３８】

本明細書に使用されるとき、「疾患」および「病的状態」という用語は、本明細書において特に指定しない限り、種または属（例えばヒト）のメンバーにとって正常または平均的であるとみなされる状態からの逸脱であって、その種または属の大多数の個体に対して有害ではない条件下において、影響を受けた個体にとって不利であるものを説明するために、交換可能に使用される。そのような逸脱は、対象または対象の任意の器官もしくは組織の正常状態の任意の機能障害（通常の機能の発揮を妨げるまたは変える）に関連付けられる状態、徴候および／または病状（例えば、下痢、吐き気、発熱、疼痛、水疱、吹出物、発疹、免疫抑制、炎症など）として明確に現れ得る。疾患または病的状態は、微生物（例えば、病原体または他の感染性病原体（例えば、ウイルスまたは真正細菌））との接触によって引き起こされるか、またはもたらされ得、環境要因（例えば、栄養不良、工業災害および／または気候）に感受性であり得、生物が有している先天的な欠陥（例えば、遺伝子異常）またはこれらの組み合わせおよび他の要因に感受性であり得る。

【００３９】

本明細書に使用されるとき、「宿主」または「対象」という用語は、本発明の組成物および方法によって処置される（例えば投与される）個体を指す。対象としては、哺乳類（例えば、マウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）、最も好ましくはヒトが挙げられるが、これに限定されない。本発明を鑑みて、「対象」という用語は、１つ以上の

本発明の組成物（免疫応答を誘導するための組成物）が投与される予定の個体または投与された個体を概して指す。

【００４０】

本明細書に使用されるとき、「不活性化している」、「不活性化」という用語および文法的に等価な用語は、微生物（例えば、病原体（例えばウイルス））への言及において使用される場合、死滅、排除、中和、および／または微生物（（例えば、病原体（例えばウイルス））の能力（感染能、および／または宿主における異常な応答および／または疾患を引き起こす能力）の低減を指す。例えば、いくつかの実施形態において、本発明は、ナノエマルション（ＮＥ）によって不活性化されている呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）を含んでいる組成物を提供する。したがって、本明細書に言及されるとき、「ＮＥによって不活性化されているＲＳＶ」、「ＮＥによって死滅したＲＳＶ」、「ＮＥによって中和されたＲＳＶ」、「ＮＥ－ＲＳＶ」または文法的に等価なものは、対象に投与される場合、宿主内のＲＳＶの複製（例えば、一定期間（例えば、数日間、数週間、数ヶ月間、またはそれ以上）にわたる）の非存在、または存在の顕著な低下によって特徴付けられる組成物を指す。

【００４１】

本明細書に使用されるとき、「融合性」という用語は、微生物病原体（例えば、真正細菌、バクテリア胞子またはウイルスカプシド）の膜と融合できるエマルションを指すことが意図されている。融合性エマルションの特定の例は本明細書に記載されている。

【００４２】

本明細書に使用されるとき、「溶原性」という用語は、微生物病原体（例えば、ウイルス（例えば、ウイルスのエンベロープ）または真正細菌もしくはバクテリア胞子）の膜を破壊できるエマルション（例えば、ナノエマルション）を指す。本発明の好ましい実施形態において、単一の組成物における溶原性剤および融合性剤の存在は、単独の剤のいずれかと比較して増強された不活性化作用を生じる。この改良された抗菌組成物を用いる（例えば、免疫応答を誘導するための（例えば、ワクチンとして使用される））方法および組成物の詳細は、本明細書に記載されている。

【００４３】

本明細書に使用されるとき、「エマルション」という用語は、古典的な水中油型または油中水型の分散液または液滴、ならびに他の脂質構造を包含しており、ここで、当該他の脂質構造は、水と混和しない油性相を水相と混合する場合に、非極性残基（例えば、長い炭化水素鎖）を水から遠ざけ、極性の頭部基を水に向ける疎水性力の結果として形成され得る。これらの他の脂質構造としては、単層、複層および多層の脂質小胞、ミセルならびにラメラ相が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、本明細書に使用されるとき、「ナノエマルション」という用語は、微小な脂質構造を含んでいる水中油型の分散液を指す。例えば、好ましい実施形態において、ナノエマルションは、約０．１から５ミクロン（例えば、直径が１５０±２５ｎｍ）の平均粒径である液滴を有している油相を含んでいるが、より小さい粒径およびより大きい粒径が考慮される。「エマルション」および「ナノエマルション」という用語は、本明細書において、本発明のナノエマルションを指してしばしば交換可能に使用される。

【００４４】

本明細書に使用されるとき、「接触」、「接触した」、「ばくろ」および「ばくろされた」という用語は、ナノエマルションおよび生きた微生物に言及して使用される場合、本発明の組成物が微生物または病原体（存在する場合）を不活性化させるように、１つ以上のナノエマルションを微生物（例えば病原体）と接触させることを指す。本発明は、微生物の不活性化のために用いられるナノエマルションの量または種類によって限定されない。本発明における用途が見出されている種々のナノエマルションが、本明細書およびそのほか（例えば、すべての目的に関してその全体が参照によって本明細書に援用される、米国特許出願第２００２００４５６６７号および第２００４００４３０４１号、ならびに米国特許第６，０１５，８３２号、第６，５０６，８０３号、第６，６３５，６７６号およ

び第６，５５９，１８９号において記載されているナノエマルション）に記載されている。ナノエマルション（例えば、微生物の不活性化（例えば、ウイルスの不活性化）に十分な）および微生物（例えば、抗原性組成物（例えば、免疫応答を誘導できる組成物）をもたらすに十分な）の比率および量は、本発明において検討されており、当該比率および量としては、本明細書に記載されたものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４５】

「界面活性物質」という用語は、水による溶媒和をエネルギー的に好む極性頭部基、および水によって十分に溶媒和されない疎水性尾部の両方を有している任意の分子を指す。「カチオン性界面活性物質」という用語は、カチオン性頭部基を有している界面活性物質を指す。「アニオン性界面活性物質」という用語は、アニオン性頭部基を有している界面活性物質を指す。

【００４６】

「親水性－親油性バランス指標数」および「ＨＬＢ指標数」という用語は、界面活性物質分子の化学的構造をその表面活性と相関させるための指標を指す。ＨＬＢ指標数は、例えば、参照によって本明細書に援用される、Meyers（例えば、Meyers, Surfactant Science and Technology, VCH Publishers Inc., New York, pp. 231-245 (1992)を参照）によって記載されたように種々の経験的な式によって計算され得る。本明細書に使用されるとき、界面活性物質のＨＬＢ指標数は、McCutcheonの第１巻：Emulsifiers and Detergents North American Edition, 1996（参照によって本明細書に援用される）においてその界面活性物質に帰属されたＨＬＢ指標数である。市販の界面活性物質に関してＨＬＢ指標数は０から約７０またはそれ以上に分布している。水に対する高い溶解性および可溶化特性を有している親水性界面活性物質は度合いの高い方の端にあり、一方で水に対して低い溶解性を有している、油中水の良好な可溶化剤である界面活性物質は度合いの低い方の端にある。

【００４７】

本明細書に使用されるとき、「相互作用促進剤」という用語は、微生物（例えば、真正細菌（例えば、グラム陰性菌）の細胞壁またはウイルスのエンベロープとエマルションとの相互作用を促進するように作用する化合物を指す。考えられる相互作用促進剤としては、キレート化剤（例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）テトラ酢酸（ＥＧＴＡ）など）およびある種の生物学的因子（例えば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）など）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４８】

「緩衝液」または「緩衝剤」という用語は、溶液に添加された場合に、その溶液がｐＨの変化に抵抗するようにする材料を指す。

【００４９】

「還元剤」および「電子供与体」という用語は、電子を第２の材料に供給して、第２の材料の原子の１つ以上の酸化状態を還元する材料を指す。

【００５０】

「一価の塩」という用語は、金属（例えば、Ｎａ、ＫまたはＬｉ）が溶液において正味１＋の電荷を有している（すなわち、電子よりも１つ多いプロトン）任意の塩を指す。

【００５１】

「二価の塩」という用語は、金属（例えば、Ｍｇ、ＣａまたはＳｒ）が溶液において正味２＋の電荷を有している任意の塩を指す。

【００５２】

「キレーター」または「キレート化剤」という用語は、金属イオンとの結合に利用できる孤立電子対を有している２つ以上の原子を有している任意の物質を指す。

【００５３】

「溶液」という用語とは、水性または非水性の混合物を指す。

【００５４】

本明細書に使用されるとき、「免疫応答を誘導するための組成物」、「免疫原性組成物

」という用語および文法的に等価な用語は、いったん対象に投与されると（例えば、１回、２回、３回またはそれ以上（例えば、数週間、数ヶ月または数年を隔てて））、対象における免疫応答を刺激するか、生じさせるか、および／または誘導する（elicit）（例えば、疾患の原因となり得る微生物（例えば病原体）に対する全体的または部分的な免疫をもたらす）組成物を指す。本発明の好ましい実施形態において、組成物はナノエマルションおよび免疫原を含んでいる。さらなる好ましい実施形態において、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物は、１つ以上の他の化合物または剤（例えば、治療薬、生理学的に許容可能な液体、ゲル、担体、希釈剤、免疫賦活剤、賦形剤、サリチル酸塩、ステロイド、免疫抑制剤、免疫刺激剤、抗体、サイトカイン、抗生物質、結合剤、充填剤、保存剤、安定化剤、乳化剤、および／または緩衝剤が挙げられるが、これらに限定されない）を含んでいる。免疫応答は、先天性の（例えば、非特異的な）免疫応答または獲得した（例えば、後天性の）免疫応答（例えば、対象における感染性、病的状態、もしくは病的状態の惹起（例えば、病原性微生物に対するばくろによって引き起こされる）を低減するか、または対象における感染性、病的状態もしくは病的状態の惹起（例えば、病原性微生物に対するばくろによって引き起こされる）を防ぐ）であり得る。したがって、いくつかの好ましい実施形態において、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物は、ワクチンとして対象に投与される（例えば、疾患を予防するか、または緩解させる（例えば、疾患に対する全体的もしくは部分的な免疫、または疾患の徴候、症状もしくは状態の全体的もしくは部分的な緩解（例えば抑制）を対象にもたらすことによる）ために）。

【００５５】

本明細書に使用されるとき、「免疫賦活剤」という用語は、免疫応答（例えば、粘膜免疫応答）を刺激し得る任意の物質を指す。いくつかの免疫賦活剤は、免疫系の細胞の活性化を引き起こし得る（例えば、免疫賦活剤は免疫細胞にサイトカインを産生および分泌させ得る）。免疫系の細胞の活性化を引き起こし得る免疫賦活剤の例としては、ＱＳ２１（ＨＰＬＣ分画による２１番目のピークに溶出する糖脂質；Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass）などの、キラヤ（Q. saponaria）の木の樹皮から精製されたサポニン；ポリ（ジ（カルボキシラートフェノキシ）ホスファゼン（ＰＣＰＰ重合体；Virus Research Institute, USA）；リポポリ多糖の誘導体（例えば、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ；Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.）、ムラミルジペプチド（ＭＤＰ；Ribi）およびスレオニル－ムラミルジペプチド（ｔ－ＭＤＰ；Ribi））；ＯＭ－１７４（リピドＡと関連するグルコサミン二糖；OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland）；およびリーシュマニアの伸長因子（精製されたリーシュマニアタンパク質；Corixa Corporation, Seattle, Wash.）が挙げられるが、これらに限定されない。従来の免疫賦活剤は当該技術分野において公知であり、例えば、リン酸アルミニウムまたはアルミニウムの水酸化物塩（「ミョウバン」）が挙げられる。いくつかの実施形態において、本発明の組成物（例えば、ナノエマルションによって不活性化されているＲＳＶを含んでいる）は、１つ以上の免疫賦活剤と共に（例えば、免疫応答をＴｈ１型またはＴｈ２型の反応に向かって進ませるために）投与される。

【００５６】

本明細書に使用されるとき、「免疫応答の誘導のための有効量」（例えば、免疫応答を誘導するための組成物における）という用語は、対象において免疫応答を刺激するか、生じさせるか、および／または誘導するために必要な投与量のレベル（例えば、対象に投与される場合）を指す。有効量は、１以上の投与（例えば、同じか、または異なる経路を介する）、用途または投与量において投与され得るが、特定の形態または投与経路に限定されると意図されていない。

【００５７】

本明細書に使用されるとき、「当該対象が免疫応答を起こすような条件下」という用語は、定性的または定量的な、免疫応答（例えば、先天性および後天性）の任意の誘導、生起および／または刺激を指す。

【００５８】

本明細書に使用されるとき、「免疫応答」という用語は、対象の免疫系による応答を指す。例えば、免疫応答としては、Ｔｏｌｌ受容体の活性化、リンホカイン（例えば、サイトカイン（例えば、Ｔｈ１型またはＴｈ２型のサイトカイン）またはケモカイン）の発現および／または分泌、マクロファージの活性化、樹状細胞の活性化、Ｔ細胞の活性化（例えば、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞）、ＮＫ細胞の活性化、および／またはＢ細胞の活性化（例えば、抗体の生成および／または分泌）における検出可能な変化（例えば増加）が挙げられるが、これらに限定されない。免疫応答のさらなる例としては、ＭＨＣ分子への免疫原（例えば、抗原（例えば、免疫原性ポリペプチド））の結合および細胞傷害性Ｔリンパ球（「ＣＴＬ」）応答の誘導、免疫原性ポリペプチドが由来している抗原に対するＢ細胞応答の誘導（例えば抗体産生）および／またはヘルパＴリンパ球応答の誘導および／または遅延型過敏性（ＤＴＨ）反応の誘導、免疫系の細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞（例えば、任意の発達段階における（例えば、プラズマ細胞）の増殖（例えば、細胞の集団の成長）、ならびに抗原提示細胞による抗原のプロセシングもしくは提示の増強が挙げられる。免疫応答は、対象の免疫系が異物と認識する免疫原（例えば、微生物（例えば病原体）由来の非自己抗原または異物と認識された自己抗原）に対するものであり得る。したがって、本明細書に使用されるとき、「免疫応答」は、任意の免疫応答（例えば、先天性の免疫応答（例えば、Ｔｏｌｌ受容体の活性化のシグナルカスケード）、細胞性媒介免疫応答（例えば、Ｔ細胞（例えば、抗原特異的Ｔ細胞）および免疫系の非特異的細胞によって媒介される反応）および体液性免疫応答（例えば、Ｂ細胞によって媒介される反応（例えば、プラズマ、リンパおよび／または組織液への抗体の産生および分泌による））が挙げられるが、これらに限定されない）を指すことが理解される。「免疫応答」という用語は、対象の免疫系の、抗原および／または免疫原に対する応答能のすべての局面（例えば、免疫原（例えば病原体）に対する初期応答、同様に適応免疫応答の結果である後天性（例えば記憶）応答の両方）を指すことが意図されている。

【００５９】

本明細書に使用されるとき、「免疫」という用語は、疾患の原因となり得る微生物（例えば病原体）に対するばくろによる疾患からの防御（例えば、疾患の徴候、症状および／または状態を防ぐことまたは低減すること（例えば、抑制））を指す。免疫は、先天性（例えば、あらかじめ抗原にさらされることなく存在している非適応性の（例えば、後天性でない）免疫応答）および／または後天性（例えば、抗原に対するあらかじめのばくろに続いてＢ細胞およびＴ細胞によって媒介される免疫応答（例えば、抗原に対する特異性および反応性の増強を示す））であり得る。

【００６０】

本明細書に使用されるとき、「免疫原」という用語は、対象において免疫応答を誘導可能な抗原（例えば、微生物（例えば、真正細菌、ウイルスまたは真菌）および／またはそれらの部分もしくは成分（例えば、タンパク質抗原））を指す。好ましい実施形態において、免疫原は、本発明のナノエマルションと組み合わせて投与された場合に免疫原（例えば、微生物（例えば、病原体または病原体産物））に対する免疫を誘導する。

【００６１】

本明細書に使用されるとき、「病原体産物」という用語は、病原体に由来する成分または産物（例えば、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、核酸、膜の構成成分および多糖が挙げられるが、これらに限定されない）を指す。

【００６２】

本明細書に使用されるとき、「増強された免疫」という用語は、組成物（例えば、本発明の免疫応答を誘導するための組成物）を投与されていない対象における適応免疫および／または獲得免疫のレベルと比べて、組成物（例えば、本発明の免疫応答を誘導するための組成物）の投与に続く、所定の免疫原（例えば、微生物（例えば病原体））に対する、対象における適応免疫および／または後天性免疫のレベルの増強を指す。

【００６３】

本明細書に使用されるとき、「精製された」または「精製する」という用語は、試料ま

たは組成物から汚染物または望まない成分を除去することを指す。本明細書に使用されるとき、「実質的に精製された」という用語は、混入物または所望されない化合物の約７０から９０％、最大で１００％を、試料または組成物から除去することを指す。

【００６４】

本明細書に使用されるとき、「投与」または「投与すること」という用語は、本発明の組成物（例えば、免疫応答を誘導するための組成物（例えば、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物））を対象に与える行為を指す。例えば、人体への投与経路としては、目（点眼）、口（経口）、皮膚（経皮）、鼻（経鼻）、肺（吸入）、口腔粘膜（頬側）、耳、直腸、注入（例えば、静脈内、皮下、腹腔内など）、局所などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６５】

本明細書に使用されるとき、「共投与」または「共投与すること」という用語は、少なくとも２以上の他の剤（例えば、ナノエマルションおよび免疫原ならびに１つ以上の剤（例えば、免疫賦活剤）を含んでいる組成物）または治療薬の投与を指す。いくつかの実施形態において、２以上の剤または治療薬の共投与は同時に行われる。いくつかの実施形態において、第２の剤／治療薬に先立って第１の剤／治療薬が投与される。いくつかの実施形態において、共投与は、同一または異なる投与経路を介して行われ得る。用いられる種々の剤または治療薬の投与の形態および／または経路は様々であり得ることを当業者は理解する。共投与に適切な適用量は、当業者によって容易に決定し得る。いくつかの実施形態において、剤または治療薬が共投与される場合、それぞれの剤または治療薬は、それら単独での投与に適切な適用量よりも少ない量において投与される。したがって、共投与は、剤または治療薬の共投与が潜在的に有害な（例えば、毒性がある）剤の必要量を減らす実施形態において、および／または、２以上の剤の共投与が、剤のうちの１つの有益な効果に対する対象の敏感性を、他の剤の共投与を介してもたらす場合において、特に望ましい。他の実施形態において、共投与は、２以上の異なる免疫原（例えば、微生物（例えば病原体））に対する、対象における免疫応答を、同時にまたは近い時間（例えば、免疫応答を誘導するための第２または第３以上の組成物の連続した投与に関して対象にとって有効である見込みのない場合）に誘導することが好ましい。

【００６６】

本明細書に使用されるとき、「局所」という用語は、皮膚、および／または粘膜細胞および組織（例えば、歯槽、頬側、舌、咀嚼、膣または鼻粘膜、ならびに中空器官または体腔を整列化する他の組織および細胞）の表面に対する本発明の組成物（例えば、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物）の適用を指す。

【００６７】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、局所エマルション、注射可能な組成物、摂取可能な溶液などの形態において投与される。例えば、経路が局所的である場合、形態は、噴霧（例えば鼻腔噴霧）、クリームまたは他の粘性の溶液（例えば、ポリエチレングリコール中の、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物）であり得る。

【００６８】

本明細書に使用されるとき、「薬学的に受容可能な」または「薬理学的に許容可能な」という用語は、対象に投与した場合、有害な反応（例えば、毒性、アレルギー性または免疫学的反応）を実質的に生じさせない組成物を指す。

【００６９】

本明細書に使用されるとき、「薬学的に受容可能な担体」という用語は、任意の標準的な薬学的担体（例えば、リン酸緩衝化生理食塩溶液、水、および種々の型の湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）、任意の溶剤およびすべての溶剤、分散媒体、コーティング剤、ラウリル硫酸ナトリウム、等張化剤および吸収遅延剤、崩壊剤（例えば、ジャガイモ澱粉または澱粉グリコール酸ナトリウム）、ポリエチレングリコールなどが挙げられるが、これらに限定されない）を指す。また、組成物は安定化剤および保存剤を含み得る。担体、安定化剤および免疫賦活剤の例は当該技術分野において公知であり、これらについて

説明されている（例えば、参照によって本明細書に援用される、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975)を参照）。

【００７０】

本明細書に使用されるとき、「薬学的に受容可能な塩」という用語は、標的の対象において生理学的に許容される、本発明の組成物の任意の塩（例えば、酸または塩基との反応によって得られる）を指す。本発明の組成物の「塩」は、無機または有機の酸および塩基に由来し得る。酸としては、例えば、塩酸、臭酸、硫酸、ニトロ酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン－ｐ－スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、スルホン酸、ナフタレン－２－スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが挙げられるが、これらに限定されない。シュウ酸などの他の酸は、それ自体が薬学的に受容可能なものではないが、本発明の組成物を得るための中間体およびそれらの薬学的に受容可能な酸付加塩として有用な塩の用意において用いられ得る。

【００７１】

塩基としては、例えば、アルキル金属（例えば、ナトリウム）水酸化物、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）水酸化物、アンモニア、および式NW_4^+（Wは$C_{1\sim4}$のアルキル）の化合物などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７２】

塩としては、例えば、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アルパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、ブチル酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩（palmoate）、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩（pivalate）、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが挙げられる。塩としては他に、例えば、Na^+、NH_4^+および$NW4^+$（Wは$C_{1\sim4}$のアルキル基）などの適切な陽イオンを伴っている、本発明の組成物の陰イオンなどが挙げられるが、これらに限定されない。治療上の使用に関して、本発明の化合物の塩は、薬学的に受容可能であると考えられる。しかしながら、薬学的に許容できない酸または塩基の塩も同様に、例えば、薬学的に受容可能な化合物の用意または精製において、用途が見出され得る。

【００７３】

治療上の使用のために、本発明の組成物の塩は、薬学的に受容可能なように考慮されている。しかしながら、非薬学的に受容可能な酸または塩基の塩も同様に、例えば、薬学的に受容可能な組成物の用意または精製において、用途が見出され得る。

【００７４】

本明細書に使用されるとき、「疾患の危険性がある」という用語は、特定の疾患にかかり易い対象を指す。この体質は遺伝的（例えば、遺伝的異常などの、疾患を患う特定の遺伝的傾向）であり得、または他の要因（例えば、年齢、環境状態、環境に存在する有害な化合物に対するばくろなど）に起因し得る。したがって、本発明は任意の特定の危険性に限定される意図はなく（例えば、対象は単に他人と接触して交流することによって「疾患の危険性があり」得る）、また本発明は任意の特定の疾患に限定される意図はない。

【００７５】

本明細書に使用されるとき、「経鼻適用」は、鼻を通じて、鼻腔経路もしくは副鼻腔経路またはその両方へ適用される意図である。この適用は、例えば、液滴、噴霧、ミスト、塗り広げまたはそれらの混合によって、鼻腔経路または副鼻腔経路に適用されて行われ得る。

【００７６】

本明細書に使用されるとき、「キット」という用語は、材料を送達するための任意の送

達系を指す。免疫原性因子（例えば、ナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物）との関係において、そのような送達系は、ある場所から他の場所への、免疫原性因子および／または補助的な資料（例えば、材料の使用のために記載された使用説明書など）の保存、輸送または送達を可能にする系を包含する。例えば、キットは、関連する免疫原性因子（例えば、ナノエマルション）および／または補助的な資料を含んでいる１つ以上の同封物（例えば、箱）を包含する。本明細書に使用されるとき、「分割されたキット（fragmented kit）」という用語は、それぞれキットの全構成物の一部を含んでいる２以上の別々の容器を含んでいる送達系を指す。容器は一緒にまた別々に、意図された受取人へ送達され得る。例えば、第１の容器は特定の用途のためのナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物を含み得、第２の容器は第２の因子（例えば、抗生物質または噴霧器）を含んでいる。実際、それぞれキットの全構成物の一部を含んでいる２以上の別々の容器を含んでいる任意の送達系が「分割されたキット」という用語に包含される。それに対して、「同梱されたキット（combined kit）」は、特定の用途に必要な免疫原性因子の構成物のすべてを１つの容器（例えば、所望の構成物の各々を収容している１つの箱）に含んでいる送達系を指す。「キット」という用語は、分割されたキットおよび同梱されたキットの両方を包含する。

【００７７】

〔発明の詳細な説明〕

２歳以下の幼児のほぼすべてが呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）に感染しており、ＲＳＶは世界規模において小児における細気管支炎の主な原因である。合衆国における毎年１２５０００の小児科における入院件数はＲＳＶによるものであり、年間の入院費用が３０００００００ドルを超えると、ＣＤＣは推定している（１）。ＲＳＶに特異的な適応的免疫応答の生起に関わらず、ＲＳＶは防御免疫をもたらさず、生涯を通じて再発を繰り返す（２，３）。ＲＳＶは、気道が狭く容易に閉塞されてしまう生後間もない乳児にとって致命的であり、ＲＳＶは、移植受容者、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の患者、高齢者、および他の慢性肺疾患（特に喘息）の患者にとって重大な病原体として広く認識されてきている。すべての年齢について合計した死亡率は１９９０～２０００年において約３０／１００００００であり、合衆国における年間の死亡者数の平均は１７０００を超えていることを、最近のデータは示している（４，５）。一定の方法において成人について綿密に試験されていないため、これらの数字は非常に低く見積もられていると思われる。したがってＲＳＶは、若年者および高齢者における、増悪化した深刻な肺疾患の原因であるだけでなく、死亡率の有意な数値に直接的に繋がっている。抗ＲＳＶ抗体は、有効であり、重篤な疾患を緩解させるようだが、それらは予防的に投与されたときにのみ機能し、易感染患者の集団におけるＲＳＶ感染に有効な他の選択肢はわずかに存在するのみである（６－１０）。

【００７８】

１９６０年代の後半において、ミョウバンによって沈殿させ、ホルマリンによって不活性化されたＲＳＶの、小児に対するワクチン接種の試みは、不成功に終わり、生きたＲＳＶの再感染による増悪化した深刻な疾患を引き起こした。臨床症状は、ワクチンを未接種の小児には見られない、増進したＴｈ２疾患、粘液の生成および好酸球増加症の結果であると考えられた。これらの同じ症状は、重度に感染した幼児に起こり得る。

【００７９】

いくつかの疫学的な研究において、感染の消退から数年後における過敏性気道疾患とさえ、重篤なＲＳＶ応答が関連付けられている（３）。Sigurs et al.は、ＲＳＶ細気管支炎に罹患して入院している幼児が、健康体の対照と比べて、１、３および７歳における喘息の発症および喘鳴挿入のより高い危険性があることを見いだした（１１－１３）。また、ＲＳＶは喘息の憎悪化と関連しており、疾患の再発期間の延長を引き起こし得る（１４）。ある興味深い研究は、重篤なＲＳＶ疾患に罹っていた幼児のＲＳＶ免疫グロブリンを用いた処置が、小児喘息および小児期の肺機能不全を発症する、後ほどの危険性を減少したため、因果関係を示した（１５）。小児および成人における慢性疾患に対する素因にな

り得るＲＳＶ疾患の、臨床的に関連する特徴の１つは、変化した免疫応答に起因する、防御免疫の獲得不能性である。また、より最近の研究は、低下した肺機能を有している患者の集団（特にＣＯＰＤ患者）は、インフルエンザ感染と関連している合併症とほとんど同程度に流行しているＲＳＶ感染に起因して、重篤な合併症の危険性を有している（１６－２０）。これらの合併症は、急性の疾患が消退の後にさえ、長期間にわたって肺に残存する能力を有しているＲＳＶの可能性によって悪化し得る。これは、ウイルスを効率的に排除しない変化した免疫環境の形成と関連している関係している仮定されている。したがって、小児および成人において使用され得る有効なワクチンは、個体群を越えた幅広い応用に対する可能性を有しており、慢性肺疾患の発症および悪化からの多大な防御を提供し得る。

【００８０】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明は特異的な免疫応答の刺激の方法および組成物を提供する。本発明は、病原性ウイルスに対する免疫応答（例えば免疫（例えば防御免疫））を誘導するための、疫学的なナノエマルション組成物、およびこれらを用いた方法を特に提供する。当該病原性ウイルスは、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばパラミクソウイルス亜科のウイルス（例えばパラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））である。本発明の組成物および方法は、なかでも、臨床用途（例えば治療薬および予防薬（例えばワクチン））および研究用途について見出されている。例示的な免疫原性組成物（例えばワクチン組成物）および組成物を投与する方法は、以下においてより詳細に記載されている。

【００８１】

いくつかの実施形態において、本発明は、ナノエマルションおよび一つ以上の免疫原（例えば不活性化されている病原体または病原体産物（例えば不活性化されているウイルス（例えば不活性化されている呼吸器合胞体ウイルス））を含んでいる、免疫応答を誘導する組成物を提供する。本発明は特定のナノエマルションに限定されない。実際に、種々のナノエマルションは、本発明における用途について見出されており、当該ナノエマルションとしては、本明細書およびそれ以外に記載されているナノエマルションが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書以外に記載されているナノエマルションは、例えば、すべての目的について参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許出願公開第２００２００４５６６７号および米国特許出願公開第２００４００４３０４１号、ならびに米国特許第６，０１５，８３２号、米国特許第６，５０６，８０３号、米国特許第６，６３５，６７６号および米国特許第６，５５９，１８９号に記載のナノエマルションである。

【００８２】

本発明の免疫原（例えば病原体または病原体産物（例えば不活性化されている病原体または病原体産物（例えば不活性化されているウイルス（例えば不活性化されている呼吸器合胞体ウイルス））））およびナノエマルションは、任意の好適な量において組み合わせられ得、種々の送達方法を利用して対象に送達され得る。任意の好適な薬学的調合物が利用され得、当該調合物としては、本明細書に記載の統合物が挙げられるが、これらに限定されない。好適な調合物は、任意の好適な方法を用いて免疫原性について試験され得る。例えば、いくつかの実施形態において、免疫原性は抗体の力価および特異的なＴ細胞応答を定量化することによって調べられる。また、本発明のナノエマルション組成物は、感染性疾患の状態の動物モデルにおいて試験され得る。好適な動物モデル、病原体および免疫原性のアッセイとしては、以下に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８３】

いくつかの実施形態において、本発明は、ナノエマルション（ＮＥ）によって不活性化されているウイルスを含んでいる組成物の粘膜投与（例えば粘膜免疫）の後に患者における免疫の成立をもたらす。当該ウイルスは、本発明を生み出す過程において同定され、特徴づけられたパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばＲＳＶ）である。また、当

該免疫は、例えば、パラミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えばパラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ））））に対する免疫である。実施例１～２に記載のように、ＮＥは、ＲＳＶに混合されて、対象におけるＲＳＶに対する免疫応答を誘導するために使用され得る室温において安定な調合物（例えば、ＮＥによって殺傷したＲＳＶ組成物）を生じる。例えば、当該調合物は、いくつかの実施形態において２週間以上、より好ましくは３週間以上、より一層好ましくは４週間以上、最も好ましくは５週間以上にわたって室温において安定である。また例えば、当該調合物は、抗ＲＳＶの免疫応答を誘導するために、単独に使用され得るか、または免疫賦活剤として使用され得る。

【００８４】

ＮＥおよびＲＳＶ（例えばＮＥによって殺傷したＲＳＶ）を含んでいる組成物の対象に対する粘膜投与は、高力価の体応答および特異的なＴｈ１細胞免疫（例えば実施例１～４を参照のこと）をもたらした。さらに動物は、ＲＳＶによる後の攻撃から防御される（実施例４参照）。ミョウバンによって沈殿させ、ホルマリンによって不活性化されたＲＳＶワクチン調製物（例えば、上述されている）と明らかに異なって、ＮＥによって不活性化された本発明のＲＳＶは、強いＴｈ１免疫応答（例えばＩＦＮ－γおよびＩＬ－１７の向上した発現（例えば実施例４を参照）によって証明されている）をもたらし、Ｔｈ２型の応答と関連しているＴｈ２サイトカイン（例えばＩＬ－４、ＩＬ－５またはＩＬ－１３）の発現の促進および／または向上を誘導しなかった。ＮＥによって殺傷したＲＳＶを含んでいる組成物の単回投与量を投与されたマウスは、投与から４週間後に抗ＲＳＶのＩｇＧの血清中濃度を形成し、当該血清中濃度は、投与後の８週間において継続して上昇し、追加免疫後において、顕しく上昇した（例えば、実施例２～４を参照）。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、ＮＥによって殺傷したＲＳＶを含んでいる組成物の単回投与（例えば、粘膜投与）が対象における防御免疫応答（例えば、防御免疫（例えば粘膜および全身性免疫））を誘導するために十分であることをもたらす。いくつかの実施形態において、対象に対する後の投与（例えば、初回免疫に投与に続く１回以上の追加投与）は、ＲＳＶに対する対象における増強された免疫応答の誘導をもたらす。したがって、本発明は、ＮＥによって殺傷したＲＳＶを含んでいる組成物の対象に対する投与がＲＳＶ感染に対する防御免疫をもたらすことを証明している。

【００８５】

細胞性免疫および体液性免疫の両方は、ＲＳＶに対する防御の役割を有していると考えられ、両方は、ＮＥの組成物を用いて誘導された（例えば、実施例１～４を参照）。ＲＳＶ特異的な抗体の力価は、ワクチン接種のヒト対象および動物モデルの防御免疫の確立に重要であると考えられる。

【００８６】

本発明の実施形態を生み出す過程において得られたデータは、ＮＥが、効率的にＲＳＶを死滅させ、ＲＳＶに対する対象における免疫応答の誘導における使用に（例えばワクチンとしての使用に）好適な非感染性の免疫化組成物の生成することを実証している。免疫原性組成物は、対象に対する投与後において、特異的な抗ＲＳＶ血清抗体の力価を誘導し、抗ウイルス性の重要な細胞性免疫応答（例えば、抗ウイルスサイトカイン産生の増加およびＲＳＶ特異的なＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞の発達が挙げられる）を開始させる。本発明の免疫原性組成物は、生きたＲＳＶの攻撃の直後における向上されたウイルスの排除をもたらす。したがって、いくつかの実施形態において、本発明の組成物および方法は、適切な本来の免疫応答を生じさせる能力をもたらし、それによって（例えばホルマリンによって殺傷したＲＳＶと比較して）より適切なワクチン戦略を提供する。当該能力は、例えば、活動的な感染によってもたらされる抗原を模倣する、認識可能な形態においてＮＥに維持されている抗原に対するばくろから生じる。

【００８７】

したがっていくつかの実施形態において、本発明（例えば、ＮＥによって殺傷したＲＳ

Ｖ）の組成物の対象への投与（例えば粘膜投与）は、（例えばＲＳＶに対する）液性免疫応答（例えば特異的な抗体の生成）および細胞性免疫応答（例えば細胞毒性Ｔリンパ球）応の誘導をもたらす。いくつかの好ましい実施形態において、本発明の組成物（例えばＮＥによって殺傷したＲＳＶ）はワクチンとして使用される。

【００８８】

（抗体の生成）

ナノエマルション（ＮＥ）によって不活性化されているパラミクソウイルス科に属するウイルス（例えばパラミクソウイルス亜科のウイルス（例えばパラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））を含んでいる組成物の免疫は、哺乳類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、テンジクネズミ、サルまたはヒト）において、ポリクローナル抗体を産生させる免疫化に使用され得る。必要に応じてニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス）抗原は、キャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニンまたは本明細書に記載の他のキャリア）と抱合され得る。宿主の種によって、種々の免疫賦活剤が免疫原性応答の増強に使用され得る。そのような免疫賦活剤としては、フロイントアジュバント、ミネラルゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および活性基質表面（例えばリゾレクチン、プルロニックポリオール、ポリアミン、ペプチド、本明細書に記載のナノエマルション、スカシガイヘモシアニンおよびジニトロフェノール）が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトに使用される免疫賦活剤のなかでも、ＢＣＧ（ウシ型弱毒結核菌ワクチン）およびCorynebacterium parvumが特に有効である。

【００８９】

ニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス）に特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養物における連続継代細胞株によって抗体分子の産生をもたらす任意の技術を用いて調製され得る。これらの技術としては、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術、およびＥＢＶハイブリドーマ技術が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Kohler et al., Nature 256, 495 497, 1985; Kozbor et al., J. Immunol. Methods 81, 3142, 1985; Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2026 2030, 1983; Cole et al., Mol. Cell. Biol. 62, 109 120, 1984を参照すればよい）。

【００９０】

さらに、好適な抗原特異性および生物学的活性を有している分子を得るために、ヒトの抗体遺伝子に対するマウスの抗体遺伝子の組合せである「キメラ抗体」の産生のために開発された技術を使用し得る（例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 68 516855, 1984; Neuberger et al., Nature 312, 604 608, 1984; Takeda et al., Nature 314, 452 454, 1985を参照すればよい）。モノクローナル抗体および他の抗体は、治療に使用されるときに抗体に対して患者が免疫応答を起こすことを防ぐために「ヒト化」され得る。そのような抗体は、治療において直接的に使用されるヒトの抗体と配列において十分に類似であり得るか、いくつかの重要な残基の改変を必要とし得る。げっ歯類の抗体とヒトの配列との間の配列の差異は、個々のアミノ酸残基の部位特異的変異誘導によるヒトの配列と異なるアミノ酸残基の置換によってか、または相補性決定領域全体のすり合わせによって最小化され得る。

【００９１】

代替的に、ヒト化された抗体は、後述のような組換え技術によって生産され得る。特定の抗原と特異的に結合する抗体は、米国特許第５，５６５，３３２号に開示されているように、部分的または完全にヒト化された抗原結合部位を含み得る。

【００９２】

代替的に、単鎖抗体の産生について述べられている技術は、特定の抗原と特異的に結合する単鎖抗体を産生するために、当該分野に公知の方法を用いて適合され得る。イディオタイプの異なる組成の、関連する特異性を有している抗体は、無作為の組合せ免疫グロブリンライブラリーからの鎖のシャッフリングによって生成され得る（例えばBurton, Proc

. Natl. Acad. Sci. 88, 11120 23, 1991を参照すればよい）。

【００９３】

また、単鎖抗体は、ＤＮＡ増幅手法（例えばハイブリドーマｃＤＮＡを鋳型として用いたＰＣＲ）によって構築され得る（例えば、Thirion et al., 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11を参照すればよい）。単鎖抗体は、単一特異的または二重特異的であり得、２価または４価であり得る。例えばColoma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63には、二重特異的な４価の単鎖抗体の構築について開示されている。二重特異的な２価の単鎖抗体は、例えばMallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206に記載されている。

【００９４】

単鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列は、後述されている通り、手動または自動のヌクレオチド合成を用いて構築され得、標準的な組換えＤＮＡ技術を用いて発現構築物にクローニングされ得、コード配列を発現させるために細胞に導入され得る。代替的に、単鎖抗体は、例えば糸状ファージ技術を用いて、直接的に生産され得る（例えばVerhaar et al., 1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nicholls et al., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91を参照すればよい）。

【００９５】

また、特定の抗原と特異的に結合する抗体は、文献に開示されているように、リンパ球集団におけるインビボ産生の誘導、免疫グロブリンのスクリーニング、または高度に特異的な結合をする試薬のパネルによって生産され得る（例えばOrlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833 3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293 299, 1991を参照すればよい）。

【００９６】

キメラ抗体は、国際公開第９３／０３１５１号に開示されているように構築され得る。また、免疫グロブリンに由来する多重特異的な多価の結合タンパク（例えば国際公開第９４／１３８０４号に記載の「ダイアボディ（daibodies）」）が調製され得る。抗体は当業者に既知の方法によって精製され得る。例えば、抗体は、関連する抗原が結合されているカラムを通過させることによって親和性精製され得る。それから、結合した抗体は、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出され得る。

【００９７】

（ナノエマルション）

本発明のナノエマルションワクチン組成物は、任意の特定のナノエマルションに限定されない。任意の数の好適なナノエマルション組成物は、本発明のワクチン組成物に利用され得、当該ナノエマルション組成物としては、表１、表２、図４および９に示されている組成物、ならびにHamouda et al., J. Infect Dis., 180:1939 (1999); Hamouda and Baker, J. Appl. Microbiol., 89:397 (2000)；およびDonovan et al., Antivir. Chem. Chemother., 11:41 (2000)に開示されている組成物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の好ましいナノエマルションは、病原体の死滅または不活性化に有効な、動物にとって無毒なナノエマルションである。したがって、好ましいエマルションは、無毒な溶媒（例えばエタノール）を利用し、低濃度のエマルションにおいてより有効な死滅を実現する。好ましい実施形態において、本発明の方法に使用されるナノエマルションは、安定であり、長い貯蔵期間（例えば１年またはそれ以上）の後にさえ分解されない。したがって、好ましいエマルションは、高温および凍結にさらした後にさえ安定性を維持している。これは、特に極端な条件の下に（例えば戦場などにおいて）使用される場合に有効である。いくつかの実施形態において、表１に記載のナノエマルションが利用されている。

【００９８】

いくつかの好ましい実施形態において、エマルションは、（ｉ）水相、（ｉｉ）油相、および少なくともさらなる１つの化合物を含んでいる。本発明のいくつかの実施形態において、これらのさらなる化合物は、組成物の水相および油相の乳化の前に混合される。これらの実施形態の一部において、１つ以上の化合物は、存在するエマルション組成物に対

してその使用の直前に、混合される。他の実施形態において、１つ以上の化合物は、存在するエマルション組成物に対してその使用の直前に、混合される。

【００９９】

本発明の組成物の使用に好適なさらなる化合物としては、１つ以上の有機物、より詳細には、有機リン酸塩に基づく溶媒、界面活性剤および界面活性物質、第四級アンモニウムを含んでいる化合物、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物、発芽促進剤、相互作用促進剤、ならびに薬学的に受容可能な化合物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の組成物における使用について意図されている種々の化合物の例示的な特定の実施形態は、以下に示されている。

【０１００】

【表１】

表1

ナノエマルション調合物

名称	油相の配合	油相 対 水の割合(容積/容積)
X8P	1容積のトリ(N-ブチル)リン酸塩	4:1
	1容積のTRITON X-100	
	8容積のダイズ油	
NN	86.5gのモノオレイン酸グリセロール	3:1
	60.1mlのノノキシノール-9	
	24.2gのGENEROL 122	
	3.27gの塩化セチルピリジニウム	
	554gのダイズ油	
W_{80}8P	86.5gのモノオレイン酸グリセロール	3.2:1
	21.2gのポリソルベート 60	
	24.2gのGENEROL 122	
	3.27gの塩化セチルピリジニウム	
	4mlのはっか油	
	554gのダイズ油	
SS	86.5gのモノオレイン酸グリセロール	3.2:1
	21.2gのポリソルベート60	(水における1%のビスマス)
	24.2gのGENEROL 122	
	3.27gの塩化セチルピリジニウム	
	554gのダイズ油	

【０１０１】

【表２】

表2
ナノエマルション調合物

ナノエマルション	組成
X8P	8%のTRITON X-100;8%のトリブチルリン酸;64%のダイズ油;20%の水
W_{20}5EC	5%のTWEEN 20;8%のエタノール;1%の塩化セチルピリジニウム;64%のダイズ油;22%の水
EC	1%の塩化セチルピリジニウム;8%のエタノール;64%のダイズ油;27%の水
Y3EC	3%のTYLOXAPOL;1%の塩化セチルピリジニウム;8%のエタノール;64%のダイズ油;24%の水
X4E	4%のTRITON X-100;8%のエタノール;64%のダイズ油;24%の水

【０１０２】
本発明のいくつかの実施形態は、エタノールを含んでいる油相を使用する。例えば、いくつかの実施形態において、（ｉ）水相、（ｉｉ）エタノールを有機溶媒として含んでいる油相、および必要に応じて発芽促進剤、ならびに（ｉｉｉ）界面活性剤としてTYLOXAPOL（好ましくは２～５％、より好ましくは３％）。この調合物態は、微生物に対して高い有効性を示し、哺乳類のユーザにとって非刺激性および無毒である（したがって粘膜に接触され得る）。

【０１０３】
いくつかの他の実施形態において、本発明のエマルションは、第２のエマルション内において乳化される第１のエマルションを含んでおり、ここで、（ａ）第１のエマルションは、（ｉ）水相；（ｉｉ）油および有機溶媒を含んでいる油相；ならびに（ｉｉｉ）界面活性剤を含んでおり、（ｂ）第２のエマルションは、（ｉ）水相、（ｉｉ）カチオン性を含んでいる有合物および油を含んでいる油相、ならびに（ｉｉｉ）界面活性剤を含んでいる。

【０１０４】
以下の記載は、組成物Ｘ８ＰおよびＸ$_{8}$Ｗ$_{60}$ＰＣにとっての組成物を含んでいる例示的なエマルションの多くをもたらす。Ｘ８Ｐは、油中の水ナノエマルションを含んでおり、その油相は、ダイズ油、トリ－ｎ－ブチルリン酸、および８０％の水におけるTRITON X-100から作製された。Ｘ$_{8}$Ｗ$_{60}$ＰＣは、Ｗ$_{80}$８ＰおよびＸ８Ｐの当量混合物を含んでいる。Ｗ$_{80}$８Ｐは、モノステアリン酸グリセロール、精製されたダイズステロール（例えば、GENEROLステロール）、TWEEN 60、ダイズ油、カチオン性のハロゲンを含んでいるＣＰＣ、およびはっか油から作製されるリポソーム様の化合物である。GENEROLファミリーは、ポリエトキシ化されたダイズステロールの一群である（Henkel Corporation, Ambler, Pennsylvania）。エマルション組成物は、本発明のある実施形態について表１に示されている。これらの特定の組成物は、参照によってそれらの全体が本明細書に援用される米国特許第５，７００，６７９号（ＮＮ）；米国特許第５，６１８，８４０号；米国特許第５，５４９，９０１号（Ｗ$_{80}$８Ｐ）；および米国特許第５，５４７，６７７号に見られ得る。

【０１０５】
Ｘ８Ｗ$_{60}$ＰＣエマルションは、Ｗ$_{80}$８ＰエマルションおよびＸ８Ｐエマルションを

個別にまず作製することによって製造される。それから、これらの２つのエマルションの混合物は、再乳化されて、Ｘ８Ｗ$_{60}$ＰＣと名づけた新たなエマルションの組成物を生成する。このようなエマルションを生成する方法は、参照によってそれらの全体が本明細書に援用される米国特許第５，１０３，４９７号および米国特許第４，８９５，４５２号に記載されている。これらの化合物は、広範な抗菌活性を有しており、膜の破壊を通して無性細菌を不活性化可能である。

【０１０６】

以上に挙げた組成物は単なる例示に過ぎず、当業者は組成の量を変えて、本発明の目的に好適なナノエマルション組成物を実現し得る。当業者は、水、および各組成物の構成要素（個々の油状担体、界面活性剤ＣＰＣおよび有機リン酸塩緩衝液）に対する油相の割合が変わり得ることを理解する。

【０１０７】

Ｘ８Ｐを含んでいる一部の組成物は４：１の水の油に対する割合を有しているが、Ｘ８Ｐがより多い水相または少ない水相を有するように調合され得るが理解される。例えば、いくつかの実施形態において、油相のそれぞれの部分に対して３、４、５、６、７、８、９または１０部以上の水相がある。同じことがＷ$_{80}$８Ｐに当てはまる。同様に、トリ（Ｎ－ブチル）リン酸塩：TRITON X-100：ダイズ油の割合は、変更され得る。

【０１０８】

表１には、特定の量のグリセロールモノオレイン酸塩、ポリソルベート　６０、グリセロール　１２２、塩化セチルピリジニウム、およびＷ$_{80}$８Ｐの担体油が挙げられているが、単なる例示に過ぎない。Ｗ$_{80}$８Ｐの特性を有しているエマルションは、異なる濃度のそれぞれのこれらの成分、または同じ機能を実現する全く異なる成分を有しているエマルションとして調合され得る。例えば、エマルションは、開始の油相において約８０～約１００ｇのグリセロールモノオレイン酸塩を有し得る。他の実施形態において、開始の油相において約１５～約３０ｇのポリソルベート　６０を有し得る。さらなる他の実施形態において、組成物は、開始の油相において約２０～約３０ｇのGENEROLステロールを含み得る。

【０１０９】

本発明のエマルションの一部の実施形態のナノエマルション構造は、それらの殺生物活性、およびこれらのエマルションの無毒性への寄与に関与し得る。例えば、Ｘ８Ｐの活性成分であるTRITON X-100は、１１％のＸ８Ｐに対応する濃度においてウイルスに対するより小さい殺生物活性を示す。界面活性剤および溶媒への油相の添加は、同じ濃度の組織培養物におけるこれらの因子の毒性を低下させる。任意の論理に縛られることなく（機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の機構に限定されない）、ナノエマルションは、その成分と病原体との相互作用を促進させる、これによって、病原体の不活性化を容易にし、それぞれの成分の毒性を低下させることが示唆されている。Ｘ８Ｐのすべての成分が、ナノエマルションの構造においてではなく、１つの組成物において組み合わせられているとき、混合物は、その成分がナノエマルションの構造において組み合わせられている場合ほどに抗菌剤として有効ではないことに留意すべきである。

【０１１０】

類似の組成を有している調合物の分類において示されるさらなる多くの実施形態が以下に示されている。後述する組成は、活性成分の種々の割合および混合物を示している。以下に挙げられている調合物が例示であり、近い比率の範囲の成分を含んでいるさらなる調合物が本発明の範囲内にあることを、当業者は理解するであろう。

【０１１１】

本発明の実施形態の一部において、約３～８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油）、約１５～２５容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）、およびいくつかの調合物において１容積％の未満のＮａＯＨを含んでいる。これらの実施形態のいくつかはＰＢＳを含んでいる。これらのいくつかの実施形態における１規定のＮａＯＨお

よび／またはＰＢＳの添加は、約４．０～約１０．０、より好ましくは約７．１～８．５の範囲のｐＨが実現されるように、ユーザが調合物のｐＨを好都合に調節することを可能にする。例えば、本発明のある実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約３．５容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油および約２３．５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３．５ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、調合物のｐＨを約７．１にするような０．０６７容積％の１規定のＮａＯＨ、約６４容積％のダイズ油、約２３．９３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣｐＨ７．１と表わされる）。さらなる他の実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、調合物のｐＨを約８．５にするような０．６７容積％の１規定のＮａＯＨ、約６４容積％のダイズ油、約２３．３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣｐＨ８．５と表わされる）。さらなる類似の他の実施形態は、約４容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ４ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ８ＥＣと表わされる）。さらなる実施形態は、約８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約１９容積％の１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書においてＹ８ＥＣ・ＰＢＳと表わされる）。

【０１１２】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、約２７容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）含んでいる（本明細書においてＥＣと表わされる）。

【０１１３】

本発明において、いくつかの実施形態は、約８容積％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、約８容積％のトリブチルリン酸（ＴＢＰ）、および約６４容積％の油（例えばダイズ油）、および約２０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる（本明細書においてＳ８Ｐと表わされる）。

【０１１４】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約１～２容積％のTRITON X-100、約１～２容積％のTYLOXAPOL、約７～８容積％のエタノール、約１容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約６４～５７．６容積％の油（例えばダイズ油）、約２３容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの調合物のいくつかは、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、および約１０ｍＭの塩化アンモニウムを含んでいる。これらの調合物のいくつかはＰＢＳを含んでいる。これらのいくつかの実施形態において、ＰＢＳを添加することは、ユーザが調合物のｐＨを好都合に調節可能にすることが考慮されている。例えば、本発明の一実施形態は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる。他の実施形態において、調合物は、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLOXAPOL、約７．２容積％のエタノール、約０．９容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、および約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５７．６容積％のダイズ油、残部の１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＥＣ/ＧＥと表わされる）。

【０１１５】

本発明の好ましい実施形態において、調合物は、約５容積％以上のTWEEN 80、約８容積％以上のエタノール、約１容積％以上のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、

約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{80}$５ＥＣと表わされる）。

【０１１６】

本発明のさらなる他の実施形態において、調合物は、約５容積％以上のTWEEN 20、約８容積％以上のエタノール、約１容積％以上のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣと表わされる）。

【０１１７】

本発明のさらなる他の実施形態において、約２～８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、約１５～２５容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。例えば、本発明は、約２容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる調合物（本明細書においてＸ２Ｅと表わされる）を意図している。類似の他の実施形態において、調合物は、約３容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ３Ｅと表わされる）。さらなる他の実施形態において、調合物は、約４容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ４Ｅと表わされる）。さらなる他の実施形態において、調合物は、約５容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ５Ｅと表わされる）。本発明の他の実施形態において、調合物は、約６容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ６Ｅと表わされる）。さらなる実施形態において、調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｅと表わされる）。さらなる実施形態において、調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のオリーブ油、約２０％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｅ　Ｏと表わされる）。さらなる他の実施形態において、調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＥＣと表わされる）。

【０１１８】

本発明の別の実施形態において、調合物は、約１～２容積％のTRITON X-100、約１～２容積％のTYLPXAPOL、約６～８容積％のＴＢＰ、約０．５～１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ）、約１～３５容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの一部の調合物は、約１～５容積％のトリプチカーゼダイズ培地、約０．５～１．５容積％の酵母抽出物、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約２０～４０容積％の液体調製粉乳を含んでいる。液体調製粉乳を含んでいるいくつかの実施形態において、当該液体調製粉乳は、カゼイン加水分解物を含んでいる（例えばNeutramigenおよびProgestimilなど）。これらの実施形態のいくつかにおいて、発明に係る調合物は、さらに約０．１～１．０容積％のチオ硫酸ナトリウム、および約０．１～１．０容積％のクエン酸ナトリウムを含んでいる。これらの基本の成分を含んでいる類似の実施形態は、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を水相として用いている。例えば、ある実施形態は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ２ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約０．９容積％のチオ硫酸ナトリウム、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ２ＰＣ　ＳＴＳ１と表わされる）。類似の他の実施形態において、発明に係る調合物は、約１．７容積％のTRITON X-100、約１．７容積％のTYLPXAPOL、約６．８容

積％のＴＢＰ、約０．８５容積％のＣＰＣ、約２９．２容積％のNEUTRAMIGEN、約５４．４容積％のダイズ油、および約４．９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において８５％のＸ２Ｙ２ＰＣ／ｂａｂｙと表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、調合物は、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％のＣＰＣ、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５７．６容積％のダイズ油、および残部の容積％の０．１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＰＣ／ＧＥと表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、調合物は、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％のＣＰＣ、約３容積％のトリプチカーゼダイズ培地、約５７．６容積％のダイズ油、および約２７．７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において９０％のＸ２Ｙ２ＰＣ／ＴＳＢと表わされる）。本発明の他の実施形態において、調合物は、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％のＣＰＣ、約１容積％の酵母溶出物、約５７．６容積％のダイズ油、および約２９．７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＰＣ／ＹＥと表わされる）。本発明のいくつかの実施形態において、調合物は、約３容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。

【０１１９】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約３容積％のTRITON X-100、約３容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ、および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＰＣと表わされる）。

【０１２０】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約４～８容積％のTRITON X-100、約５～８容積％のＴＢＰ、約３０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約０～３０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの一部の実施形態は、約１容積％のＣＰＣ、約１容積％の塩化ベンザルコニウム、約１容積％の臭化セチルイリジウム、約１容積％の臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、５００μＭのＥＤＴＡ、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５ｍＭのイノシン、および約５ｍＭのＬ－アラニンをさらに含んでいる。例えば、これらの特定の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐと表わされる）。他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣと表わされる）。さらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＡＴＢ－Ｘ１００１と表わされる）。また他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約２容積％のＣＰＣ、約５０容積％のダイズ油、および約３２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＡＴＢ－Ｘ００２と表わされる）。他の実施形態は、約４容積％のTRITON X-100、約４容積％のＴＢＰ、約０．５容積％のＣＰＣ、約３２容積％のダイズ油、および約５９．５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において５０％のＸ８ＰＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約０．５容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１９．５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ$_{1/2}$と表わされる）。本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約２容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ２と表わされる）。他の

実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の塩化ベンザルコニウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＢＣと表わされる）。本発明の別の実施形態において、組成物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の臭化セチルイリジウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐ　ＣＰＢと表わされる）。本発明の例示的な他の実施形態において、組成物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐ　ＣＴＡＢと表わされる）。本発明の例示的な他の実施形態において、本発明は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約５００μＭＥＤＴＡ、約６４容積％のダイズ油、および約１５．８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ　ＥＤＴＡと表わされる）。さらなる類似の実施形態は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５ｍＭのイノシン、約５ｍＭのＬ－アラニン、約６４容積％のダイズ油および約１９容積％のＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ　ＧＥ$_{1x}$と表わされる）。本発明の他の実施形態において、本発明に係る調合物は、さらに、約５容積％のTRITON X-100、約５容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約４０容積％のダイズ油および約４９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ５Ｐ$_5$Ｃと表わされる）。

【０１２１】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約２容積％のTRITON X-100、約６容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ６Ｅと表わされる）。

【０１２２】

本発明のさらなる実施形態において、調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）および約１５～２０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。特定の関連する実施形態は、さらに約１容積％のＬ－アスコルビン酸を含んでいる。例えば、ある特定の実施形態は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｇと表わされる）。さらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約１容積％のＬ－アスコルビン酸、約６４容積％のダイズ油および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＧＶ$_C$と表わされる）。

【０１２３】

さらなる実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、０．５～０．８容積％のTWEEN 60、約０．５～２．０容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）および約１５～２５容積％の水相（ＤｉＨ$_2$Ｏは、ＰＢＳ）を含んでいる。例えば、特定の一実施形態において、調合物は、約８容積％のTRITON X-100、０．７容積％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油および約１８．３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｗ６０ＰＣ$_1$と表わされる）。関連する他の実施形態は、約８容積％のTRITON X-100、０．７１容積％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約１８．２９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ６０$_{0.7}$Ｘ８ＰＣと表わされる）。他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のTRITON X-100、０．７容積％のTWEEN 60、約０．５容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４～７０容積％のダイズ油および約１８．８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｗ６０ＰＣ$_2$と表わされる）。さらなる他の実施形態において、本発明は、約８容積％のTRITON X-100、０．７１容積％のTWEEN 60、約２容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約

１７．３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる。本発明の他の実施形態において、調合物は、約０．７１容積％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油および約２５．２９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ６０$_{0.7}$ＰＣと表わされる）。

【０１２４】

本発明の他の実施形態において、調合物は、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）および約２０～３０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）に加えて、約８容積％のグリセロールまたは約８容積％のＴＢＰのいずれか、および約２容積％のジオクチルスルホスクシネートを含んでいる。例えば、いくつかの実施形態は、約６４容積％のダイズ油および約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏに加えて、約２容積％のジオクチルスルホスクシネートおよび約８容積％のグリセロールを含んでいる（本明細書においてＤ２Ｇと表わされる）。本発明の他の実施形態において、発明に係る調合物は、約２容積％のジオクチルスルホスクシネート、約８容積％のグリセロール、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油および約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＤ２Ｐと表わされる）。

【０１２５】

本発明のさらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８～１０容積％のグリセロール、約１～１０容積％のＣＰＣ、約５０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの実施形態の一部において、調合物は、さらに約１容積％のＬ－アスコルビン酸を含んでいる。例えば、特定の一実施形態は、さらに約８容積％のグリセロール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約２７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣと表わされる）。関連する実施形態は、約１０容積％のグリセロール、約１０容積％のＣＰＣ、約６０容積％のダイズ油、および約２０容積％の水相ＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣ１０と表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約１０容積％のグリセロール、約１容積％のＣＰＣ、約１容積％のＬ－アスコルビン酸、約６４容積％のダイズもしくは油、および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣＶ$_C$と表わされる）。

【０１２６】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約８～１０容積％のグリセロール、約８～１０容積％のＳＤＳ、約５０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの実施形態の一部において、さらに約１容積％のレクチン、および約１容積％のｐ－ヒドロキシベンゼン酸メチルエステルを含んでいる。そのような調合物の例示的な実施形態は、約８容積％のＳＤＳ、約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳ８Ｇと表わされる）。関連する調合物は、約８容積％のグリセロール、約８容積％のＳＤＳ、約１容積％のレクチン、および約１容積％のｐ－ヒドロキシベンゼン酸メチルエステル、約６４容積％のダイズ油、および約１８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳ８ＧＬ１Ｂ１と表わされる）。

【０１２７】

本発明のさらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約４容積％のTWEEN 80、約４容積％のTYLOXAPOL、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{80}$４ＹＥＣと表わされる）。

【０１２８】

本発明のいくつかの実施形態において、発明に係る調合物は、約０．０１容積％のＣＰＣ、約０．０８容積％のTYLOXAPOL、約１０容積％のエタノール、約７０容積％のダイズ油、および約１９．９１容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ．０８Ｅ

Ｃ．０１と表わされる）。

【０１２９】

本発明のさらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約８容積％のラウリル硫酸ナトリウム、および約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳＬＳ８Ｇと表わされる）。

【０１３０】

上述した特定の調合物は、本発明における用途を見出している種々の組成を示す単なる例示である。本発明は、上述の調合物の多くのバリエーションおよびさらなるナノエマルションが、本発明の方法における用途について見出されることを意図している。エマルションの候補物が本発明の使用に好適か否かを決定するために、３つの基準が検討され得る。本明細書に記載の方法および基準を用いて、エマルションの候補物は、それらが好適か否かを容易に決定するために試験され得る。最初に、エマルションが形成され得るか否かを決定するために、本明細書に記載の方法を用いて所望の成分が調製される。エマルションが形成され得ない場合、その候補物を不採用にする。例えば、４．５％のチオ硫酸ナトリウム、０．５％のクエン酸ナトリウム、１０％のｎ－ブタノール、６４％のダイズ油および２１％のＤｉＨ$_2$Ｏからなる組成物の候補物は、エマルションを形成しなかった。

【０１３１】

第２に、好ましい実施形態において、エマルションの候補物は、安定なエマルションを形成すべきである。予定されている使用を許容する十分な期間にわたってエマルションの形状を維持する場合に、エマルションは安定である。例えば、貯蔵、輸送などがなされるエマルションにとって、数ヶ月間から数年間にわたって組成物がエマルションの形態を維持することが所望されている。相対的に不安定である典型的なエマルションは、一日以内に形態を損なう。例えば、８％の１－ブタノール、５％のTWEEN 10、１％のＣＰＣ、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏからなる組成物の候補物は、安定なエマルションを形成しなかった。以下のエマルションの候補物は、本明細書に記載されている方法を用いて、安定なことが示されている。０．０８％のTRITON X-100、０．０８％のグリセロール、０．０１％の塩化セチルピリジニウム、９９％のバター、０．８３％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において１％のＸ８ＧＣ　Ｂｕｔｔｅｒと表わされる）；０．８％のTRITON X-100、０．８％のグリセロール、０．１％の塩化セチルピリジニウム、６．４％のダイズ油、１．９％のＤｉＨ$_2$Ｏ、および９０％のバター（本明細書において１０％のＸ８ＧＣ　Ｂｕｔｔｅｒと表わされる）；２％のＷ２０５ＥＣ、１％のNatrosol 250L NF、および９７％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｌ　ＧＥＬと表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、１％の塩化セチルピリジニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の粘度７０の鉱物油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　７０　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の粘度３５０の鉱物油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　３５０　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）。

【０１３２】

第３に、エマルションの候補物は、予定されている用途に対する有効性を有しているべきである。例えば、抗菌性のエマルションは、検出可能なレベルまで病原体を死滅させるか、または無力化にしなければならない。本明細書に示されているように、本発明のエマルションの一部は、特定の微生物に対して有効性を示すが、他の微生物に対して有効性を示さない。本明細書に記載の方法を用いて、所望の微生物に対するエマルションの特定の候補物の決定が可能である。これは、好適な対照のサンプル（例えば水のような陰性対照）を用いた実験と並行した、１以上の期間にわたるエマルションに対する微生物のばくろ、ならびにエマルションが微生物を死滅させるか、または無力化するか否か、および死滅もしくは無力化に至る程度を決定することを一般的に含んでいる。例えば、１％の塩化アンモニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のダイズ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏからなる組成物の候補物は、有効なエマルションではないと示された。以下のエマルションの候補物は、本明細書に記載の方法を用いて、有効であると示された；５％の

TWEEN 20、５％の塩化セチルピリジウム、１０％のグリセロール、６０％のダイズ油、および２０％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣ５と表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、１０％のグリセロール、６４％のダイズ油、および２０％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のオリーブ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｏｌｉｖｅ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の亜麻仁油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｆｌａｘｓｅｅｄ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のコーン油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｒｎ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のココナッツ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｃｏｎｕｔｔ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の綿種油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｔｔｏｎ　Ｏｉｌと表わされる）；８％のデキストロース、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　Ｄｅｘｔｒｏｓｅと表わされる）；８％のPEG 200、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　ＰＥＧ　２００と表わされる）；８％のメタノール、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　Ｍｅｔｈａｎｏｌと表わされる）；８％のPEG 1000、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　ＰＥＧ　１０００と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のNatrosol 250H NF、および９６％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％のＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　２、２％のＷ$_{20}$５ＥＣ　ＧＥＬとも表される）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、１％のNatrosol 250H NF、および９７％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％のＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　１と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、３％のNatrosol 250H NF、および９５％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％のＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　３と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、０．５％のNatrosol 250H NF、および９７．５％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　０．５と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のMethocel A、および９６％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｅｔｈｏｃｅｌ　Ａと表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のMethocel K、および９６％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｅｔｈｏｃｅｌ　Ｋと表わされる）；２％のNatrosol、０．１％のＸ８ＰＣ、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、およびｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において０．１％　Ｘ８ＰＣ／ＧＥ＋２％　Ｎａｔｒｏｓｏｌ）；２％のNatrosol、０．８％のTRITON X-100、０．８％のトリブチルリン酸塩、６．４％のダイズ油、０．１％の塩化セチルピリジウム、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、およびｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において１０％のＸ８ＰＣ／ＧＥ＋２％　Ｎａｔｒｏｓｏｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のラード、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｌａｒｄと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のミネラル油、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）；０．１％の塩化セチルピリジウム、２％のNerolidol、５％のTWEEN 20、１０％のエタノール、６４％のダイズ油、および２０．９％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　０．１と表わされる）；１０％の塩化セチルピリジウム、８％のトリブチルリン酸塩、８％のTWEEN 20、５４％のダイズ油、および２０％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＸ８ＰＣ１０と表わされる）；５％の塩化セチルピリジウム、８％のTRITON-100、８％のトリブチルリン酸塩、５４％のダイズ油、お

よび２０％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＸ８ＰＣ５と表わされる）；０．０２％の塩化セチルピリジウム、０．１％のTWEEN－２０、１０％のエタノール、７０％のダイズ油、および１９．８８％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$０．１ＥＣ$_{0.02}$と表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN－２０、８％のグリセロール、６４％のMobile 1、および２２％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣ　Ｍｏｂｉｌｅ　１と表わされる）；７．２％のTRITON-100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、および２５．８７％のｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％のＸ８ＰＣ／ＧＥと表わされる）；７．２％のTRITON-100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、１％のＥＤＴＡ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、０．１×ＰＢＳおよびｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％のＸ８ＰＣ／ＧＥ　ＥＤＴＡと表わされる）；ならびに７．２％のTRITON-X 100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、１％のチオ硫酸ナトリウム、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、０．１×ＰＢＳおよびｄｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％のＸ８ＰＣ／ＧＥ　ＳＴＳと表わされる）。

【０１３３】

１．水相

いくつかの実施形態において、エマルションは、水相を含んでいる。好ましい特定の実施形態において、エマルションは、（他の濃度も意図されているが）約５～５０、好ましくは１０～４０、より好ましくは１５～３０容積％の水相を含んでいる。好ましい実施形態において、水相は、４～１０、好ましくは６～８のｐＨの水相を含んでいる。水は好ましく脱イオン化されている（以下において「ＤｉＨ$_2$Ｏ」とする）。いくつかの実施形態において、水相はリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、水相は、滅菌されており、発熱物質を含んでいない。

【０１３４】

２．油相

いくつかの実施形態において、エマルションは、油相を含んでいる。好ましい特定の実施形態において、本発明のエマルションの油相（例えば、キャリアオイル）は、エマルションの総容積を基準にして、３０～９０、好ましくは６０～８０、より好ましくは６０～７０容積％の油を含んでいる（が、より高い濃度およびより低い濃度が本明細書に記載のエマルションにおける用途について見出されている）。

【０１３５】

ナノエマルションワクチンにおける油は、化粧品的または薬学的に受容可能な油であり得る。油は、揮発性または不揮発性であり得、動物性油脂、植物性油脂、天然油脂、合成油脂、炭化水素、シリコン油脂、その半合成誘導体およびこれらの組合せから選択され得る。

【０１３６】

好適な油としては、以下の油が挙げられるが、これらに限定されない；ミネラル油、スクワラン油、芳香油、シリコン油、エッセンシャル油、非水溶性ビタミン、ステアリン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、パルミチン酸オクチル、パルミチン酸セチル、トリデシルベヘネート、アジピン酸ジイソプロピル、セバシン酸ジオクチル、アントラニル酸メンチル、オクタン酸セチル、サリチル酸オクチル、ミリスチン酸イソプロピル、ネオペンチルグリコール、ジカプリン酸セトール、セラフィルズ（登録商標）、デシルオレイン酸、アジピン酸ジイソプロピル、乳酸Ｃ１２－１５アルキル、乳酸セチル、乳酸ラウリル、ネオペンタン酸イソステアリル、乳酸ミリスチル、ステアリン酸イソセチルステアロイルステアリン酸、オクチルドデシルステアロイル、炭化水素油、イソパラフィン、流動パラフィン、イソドデカン酸、ペトロラクタム、アルガン油、キャノーラ油、チリトウガラシ油、ココナッツ油、コーン油、綿種油、亜麻仁油、ブドウ種油、カラシ油、オリーブ油

、ヤシ油、ヤシ種油、ピーナッツ油、松の実油、ケシの実油、かぼちゃの種油、コメ糠油、サフラン油、茶油、フランスショウロ（タッフル）油、植物性油、アプリコット（種）油、ホホバ油（ホホバ種油）、ブドウ種油、マカダミア油、小麦胚芽油、アーモンド油、菜種油、ひょうたん油、ダイズ油、ゴマ油、ヘーゼルナッツ油、トウモロコシ油、ヒマワリ油、アサ油、ボイス油、クキナッツ油、アボカド油、クルミ油、魚油、ベリー油、オールスパイス油、ネズ油、種子油、アーモンド種油、アニス種油、セロリ種油、クミン種油、ナツメグ種油、葉油、バジル葉油、ローリエ油、シナモン葉油、コモンセージ葉油、ユーカリノキ油、レモングラス葉油、ティーツリー葉油、オレガノ葉油、パチョリ葉油、ペパーミント葉油、松葉油、シラタマノキ葉油、花油、ラベンダー花油、ティーツリー花油、マルホラム（Marhoram）花油、オレンジ花油、バラ花油、イラン－イラン花油、キナ皮油、カシア桂皮油、シナモン桂皮油、ササフラス桂皮油、樹木油、クスノキ樹木油、シーダー樹木油、ローズウッド油、ビャクダン油、地下茎（ショウガ）樹木油、マツヤニ油、乳香油、ミルラ油、皮油、ベルガモット油、グレープフルーツ皮油、レモン皮油、ライム皮油、オレンジ皮油、タンジェリン皮油、根油、カノコソウ（吉草根）根油、オレイン酸、リノレン酸、オレイルアルコール、イソステアリルアルコール、その半合成誘導体、およびこれらの任意の組合せ。

【０１３７】

油は、シリコン構成要素における単独の油であり得るか、または他のシリコンおよび非シリコンの揮発性油および不揮発性油と組み合わせられ得るシリコン成分（例えば揮発性シリコン油）をさらに含み得る。好適なシリコン構成要素としては、以下の構成要素が挙げられるが、これらに限定されない；メチルフェニルポリシロキサン、シメチコン、ジメチコン、フェニルトリメチコン（またはその有機修飾版）、シリコン重合体のアルキル化誘導体、セチルジメチコン、ラウリルトリメチコン、ジメチコノールのようなシリコンシリコン重合体の水酸化誘導体、揮発性シリコン油、環状および直鎖状のシリコン、シクロメチコン、シクロメチコンの誘導体、ヘキサメチルシクロトリシロキサン、オクタメチルシクロテトラシロキサン、デカメチルシクロペンタシロキサン、揮発性の直鎖状ジメチルポリシロキサン、イソヘキサデカン、イソエイコサン、イソテトラコサン、ポリイソブテン、イソオクタン、イソドデカン、これらの半合成誘導体、ならびにこれらの組合せ。

【０１３８】

揮発性油は、有機溶媒であり得るか、または有機溶媒に添加されて存在し得る。好適な揮発性油としては、テルペン、モノテルペン、セスキテルペン、駆風剤（carminative）、アズレン、メントール、カンファー、ツジョン、チモール、ネロール、リナロール、リモネン、ゲラニオール、ペリリルアルコール、ネロリドール、ファルネソール、イランゲン、ビサボロール、ファルネセン、アスカリドール、ケノポジ油、シトロネラル、シトラール、シトロネロール、カマズレン、ノコギリソウ（yarrow）、グアヤアズレン（guaiazulene）、カモミール、これらの半合成誘導体、およびこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３９】

本発明の一局面において、シリコン成分の揮発性油は油相における油と異なる。

【０１４０】

いくつかの実施形態において、油相は、エマルションの総容積を基準にして、３～１５、好ましくは５～１０容積％の有機溶媒を含んでいる。本発明は任意の特定の機序に限定されないが、エマルションに使用される有機リン酸塩に基づく溶媒は、病原体の膜における脂質の除去または崩壊に役立つことが意図されている。したがって、微生物の膜におけるステロールまたはリン脂質を除去する任意の溶媒は、本発明の方法における用途について見出される。好適な有機溶媒としては、有機リン酸塩に基づく溶媒またはアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの好ましい実施形態において、無毒なアルコール（例えばエタノール）が溶媒として用いられる。油相、および当該油相に供給されるさらなる任意の化合物は、滅菌されており、発熱物質を含んでいないことが好ましい。

【０１４１】
３．界面活性剤（surfactants）および界面活性剤（detergents）
いくつかの実施形態において、エマルションは、界面活性剤または界面活性物質をさらに含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、エマルションは、約３～１５％、より好ましくは約１０％の１つ以上の界面活性剤または界面活性物質を含んでいる（が他の濃度も考えられる）。本発明は任意の特定の機序に限定されないが、界面活性剤がエマルションに存在する場合、エマルションの安定化を助ける。非イオン性（非陰イオン性）およびイオン性の界面活性剤が考えられる。さらに、界面活性剤のBRIJファミリーの界面活性剤は、本発明の組成物における用途について見出されている。界面活性剤は、水相または油相の両方に供給され得る。エマルションをともなった使用に好適な界面活性剤としては、陰イオン性および非イオン性の種々の界面活性剤、ならびに水中油エマルションの形成を促進可能な他の乳化化合物が挙げられる。一般的に、乳化化合物は、相対的に親水性であり、乳化化合物の混合物は、必要な性質をもたらすために使用され得る。いくつかの調合物において、非イオン性の界面活性剤は、イオン性の乳化剤よりも、それらが広範なｐＨ範囲と実質的により適合性であること、より安定なエマルションをしばしば形成することについてイオン性の乳化剤を超える利点を有している。
【０１４２】
本発明のナノエマルションワクチンにおける界面活性剤は、薬学的に受容可能なイオン性の界面活性剤、薬学的に受容可能な非イオン性の界面活性剤、薬学的に受容可能な陰イオン性の界面活性剤、または薬学的に受容可能な両イオン性の界面活性剤であり得る。
【０１４３】
例示的な有用な界面活性剤は、参照によって特に援用されるApplied Surfactants: Principles and Applications. Tharwat F. Tadros, Copyright 8 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-30629-3に記載されている。さらに、界面活性剤は、薬学的に受容可能なイオン性重合体の界面活性剤、薬学的に受容可能な非イオン性重合体の界面活性剤、薬学的に受容可能な陽イオン性重合体の界面活性剤、薬学的に受容可能な陰イオン性重合体の界面活性剤、または薬学的に受容可能な両イオン性重合体の界面活性剤であり得る。重合体の界面活性剤の例としては、以下の界面活性剤：複数の（少なくとも１つの）酸化ポリエチレン（ＰＥＯ）側鎖を有しているポリ（メチルメタクリル酸）融合共重合体主鎖、ポリヒドロキシステアリン酸、アルコキシル化アルキルフェノールホルムアルデヒド圧縮物、ポリアルキレングリコールの脂肪酸水酸化物による改変ポリエステル、ポリエステル、その半合成誘導体、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１４４】
界面活性剤または界面活性物質は、非極性の疎水性部分からなる両親媒性の分子であり、当該疎水性部分は、通常、極性部分または親水性部分と結合している、直線状または分枝鎖状の炭化水素鎖またはフッ化炭素鎖（８～１８個の炭素原子を含んでいる）である。親水性部分は、非イオン性、イオン性または双性イオン性であり得る。炭化水素鎖は、水性環境において水分子と弱く相互作用し、極性またはイオン性の頭部基は、双極子またはイオン－双極子の相互作用によって水分子と強く相互作用する。親水性基の性質に基づいて、界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、双性イオン性、非イオン性、および重合体の界面活性剤に分類される。
【０１４５】
好適な界面活性剤としては、以下の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない；９～１０ユニットのエチレングリコールを含んでいるエトキシル化ノニルフェノール、８ユニットのエチレングリコールを含んでいるエトキシル化ウンデカノール、ポリオキシエチレン（２０）モノラウリル酸ソルビタン、ポリオキシエチレン（２０）モノパルミチン酸ソルビタン、ポリオキシエチレン（２０）モノステアリン酸ソルビタン、ポリオキシエチレン（２０）モノオレイン酸ソルビタン、エトキシル化された水酸化リシン油、ラウリル硫酸ナトリウム、酸化エチレンおよび酸化プロピレンのブロック共重合体、酸化エチ

レン－酸化プロピレンブロック共重合体、および酸化エチレンおよび酸化プロピレンを基材としたテトラ機能的ブロック共重合体、グリセリルモノエステル、カプリン酸グリセリル、カプリル酸エステルグリセリル、グリセリルコケート、グリセリルエルケート、ヒドロキシステアリン酸グリセリル、イソステアリン酸グリセリル、ＰＡＢＡグリセリル，パルミチン酸グリセリル、リシノール酸グリセリル、ステアリン酸グリセリル、グリセリルチグリコレート、ジラウリン酸グリセリル、ジオレイン酸グリセリル、ジミリスチン酸グリセリル、ステアリン酸グリセリル、セスイオレイン酸グリセリル、乳酸グリセリルステアレート、ポリオキシエチレンセチル／ステアリルエーテル、ポリオキシエチレンコレステロールエーテル、ポリオキシエチレンラウリン酸またはジラウリン酸、ポリオキシエチレンステアリン酸またはジステアリン酸、ポリオキシエチレン脂肪エーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンミリスチルエーテル、ステロイド、コレステロール、ベタシトステロール、ビサボロール、アルコール類の脂肪酸エステル、ミリスチン酸イソプロピル、ｎ－酪酸脂肪族－イソプロピル、ｎ－ヘキサン酸イソプロピル、デカン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸オクチルドデシル、アルコキシル化アルコール、アルコキシル化酸、アルコキシル化アミド、アルコキシル化糖誘導体、天然油およびワックスのアルコキシル化誘導体、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロック共重合体、ノノオキシノール－１４、ラウリン酸ＰＥＧ－８、ＰＥＧ－６ココアミド、メチルグルコースセスキステアリン酸ＰＥＧ－２０、ＰＥＧ－４０ラノリン、ＰＥＧ－４０ヒマシ油、ＰＥＧ－水素化ヒマシ油、ポリオキシエチレン脂肪酸エーテル、グリセリルジエステル、ポリオキシエチレンステアリン酸エーテル、ポリオキシエチレンミリスチン酸エーテル、およびポリオキシエチレンラウリン酸エーテル、ジラウリン酸グリセリル、ジミリスチン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、それらの半合成誘導体、ならびにそれらの混合物。

【０１４６】

さらなる好適な界面活性剤としては、ラウリン酸グリセリル、ミリスチン酸グリセリルジラウリン酸、グリセリル、ジミリスチン酸グリセリル、それらの半合成誘導体、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４７】

さらなる実施形態において、界面活性剤は、約２～約１００の基の範囲にあるポリオキシエチレンの頭部基を有しているポリオキシエチレン脂肪エーテル、またはR_5－（OCH_2CH_2）$_y$－ＯＨの構造を有しているアルコキシル化アルコールであり、ここでR_5は、約６～約２２の炭素原子を有している分枝鎖状または非分枝鎖状のアルキル基であり、ｙは約４～約１００であり、好ましくは約１０～約１００である。好ましくはアルコキシル化アルコールは、R_5がラウリル基グループであり、ｙが２３の平均値を有している種である。

【０１４８】

異なる実施形態において、界面活性剤は、ラノリンアルコールのエトキシル化誘導体であるアルコキシル化アルコールである。ラノリンアルコールのエトキシル化誘導体は、エトキシル化の平均値が１０であるラノリンアルコールのポリエチレングリコールエーテルであるラネス（laneth）－１０であることが好ましい。

【０１４９】

非イオン性の界面活性剤としては、以下の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない；エトキシル化された界面活性剤、エトキシル化されたアルコール、エトキシル化されたアルキルフェノール、エトキシル化された脂肪酸、エトキシル化されたモノアルカオル（monoalkaol）アミド、エトキシル化されたソルビタンエステル、エトキシル化された脂肪酸アミノ、酸化エチレン－酸化プロピレン共重合体、ビス（ポリエチレングリコールビス［イミダゾイル　カルボニル］）、ノノキシノール－９、ビス（ポリエチレングリコールビス［イミダゾイル　カルボニル］）、Brij（登録商標） 35、Brij（登録商標） 56、Brij（登録商標） 72、Brij（登録商標） 76、Brij（登録商標） 92V、Brij（登録商標）97、Brij（登録商標）58P、Cremophor（登録商標） EL、デカエチレングリコールモ

ノドデシルエーテル、Ｎ－デカノイル－Ｎ－メチルグルカミン、ｎ－デシル　α－Ｄ－グルコピラノシド、デシル　β－Ｄ－マルトピラノシド、ｎ－ドデカノイル－Ｎ－メチルグルカミド、ｎ－ドデシル　α－Ｄ－マルトシド、ｎ－ドデシル　β－Ｄ－マルトシド、ｎ－ドデシル　β－Ｄ－マルトシド、ヘプタエチレングリコールモノデシルエーテル、ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ヘプタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、ｎ－ヘキサデシル　β－Ｄ－マルトシド、ヘキサエチレングリコールモノドデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、イゲパル　ＣＡ－６３０、イゲパル　ＣＡ－６３０、メチル－６－（Ｎ－ヘプチルカルバモイル）－α－Ｄ－グルコピラノシド、ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル、Ｎ－ノナノイル－Ｎ－メチルグルカミン、Ｎ－ノナノイル－Ｎ－メチルグルカミン、オクタエチレングリコールモノデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、オクチル－β－Ｄ－グルコピラノシド、ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクチルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールエーテル　Ｗ－１、ポリオキシエチレン　１０　トリデシルエーテル、ステアリン酸ポリオキシエチレン　１００、ポリオキシエチレン　２０イソヘキサデシルエーテル、ポリオキシエチレン　２０オレイルエーテル、ステアリン酸ポリオキシエチレン　４０、ステアリン酸ポリオキシエチレン　５０、ポリステアリン酸オキシエチレン　８、ポリオキシエチレンビス（イミダゾイルカルボニル）、ステアリン酸ポリオキシエチレン　２５プロピレングリコール、キラヤ樹皮のサポニン、Span（登録商標） 20、Span（登録商標） 40、Span（登録商標） 60、Span（登録商標） 65、Span（登録商標） 80、Span（登録商標） 85、テルジトール　５－Ｓ－１２型、テルジトール　１５－Ｓ－３０型、テルジトール　１５－Ｓ－５型、テルジトール　１５－Ｓ－７型、テルジトール　１５－Ｓ－９型、テルジトール　ＮＰ－１０型、テルジトール　ＮＰ－４型、テルジトール　ＮＰ－４０型、テルジトール　ＮＰ－７型、テルジトール　ＮＰ－９型、テルジトール、テルジトール　ＴＭＮ－１０型、テルジトール　ＴＭＮ－６型、テトラデシル－β－Ｄ－マルトシド、テトラエチレングリコールモノデシルエーテル、テトラエチレングリコールモノドデシルエーテル、テトラエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、トリエチレングリコールモノデシルエーテル、トリエチレングリコールモノドデシルエーテル、トリエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、トリエチレングリコールモノオクチルエーテル、トリエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、Triton CF-21、Triton CF-32、Triton DF-12、Triton DF-16、Triton GR-5M、Triton QS-15、Triton QS-44、TRITON X-100、Triton X-102、Triton X-15、Triton X-151、Triton X-200、Triton X-207、Triton（登録商標） X-100、Triton（登録商標） X-114、Triton（登録商標） X-165、Triton（登録商標） X-305、Triton（登録商標） X-405、Triton（登録商標） X-45、Triton（登録商標） X-705-70、TWEEN（登録商標） 20、TWEEN（登録商標） 21、TWEEN（登録商標） 40、TWEEN（登録商標） 60、TWEEN（登録商標） 61、TWEEN（登録商標） 61、TWEEN（登録商標） 65、TWEEN（登録商標） 80、TWEEN（登録商標） 81、TWEEN（登録商標） 85、TYLOXAPOL、ｎ－ウンデシル　β－Ｄ－グルコピラノシド、これらの半合成誘導体、またはこれらの組合せ。

【０１５０】

さらに、非イオン性の界面活性剤はPoloxamerであり得る。Poloxamerは、以下の順に続くブロック：ポリオキシエチレンのブロック、ポリオキシプロピレンのブロックおよびポリオキシエチレンのブロックから生成されている重合体である。ポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンの平均ユニット数は、重合体に結合する数に基づいて変化する。例えば、最も小さい重合体であるPoloxamer 101は、平均して２ユニットのポリオキシエ

チレンを有しているブロック、平均して１６ユニットのポリオキシプロピレンを有しているブロック、および平均して２ユニットのポリオキシエチレンを有しているブロックからなる。Poloxamerは、無色の液体およびペーストから白色の固体にまで及ぶ。化粧品および日用品において、Poloxamerは、洗顔料、入浴剤、洗髪剤、整髪料、口腔洗浄剤、アイメイクの除去剤、および他の肌製品および頭髪製品の調合物において使用されている。Poloxamerの例としては、Poloxamer 101、Poloxamer 105、Poloxamer 108、Poloxamer 122、Poloxamer 123、Poloxamer 124、Poloxamer 181、Poloxamer 182、Poloxamer 183、Poloxamer 184、Poloxamer 185、Poloxamer 188、Poloxamer 212、Poloxamer 215、Poloxamer 217、Poloxamer 231、Poloxamer 234、Poloxamer 235、Poloxamer 237、Poloxamer 238、Poloxamer 282、Poloxamer 284、Poloxamer 288、Poloxamer 331、Poloxamer 334、Poloxamer 335、Poloxamer 338、Poloxamer 401、Poloxamer 402、Poloxamer 403、Poloxamer 407、安息香酸Poloxamer 105の安息香酸塩、およびPoloxamer 182の二安息香酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５１】

好適なカチオン性の界面活性剤としては、以下の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない；第四級アンモニウム化合物、アルキルトリメチル塩化アンモニウム化合物、ジルキルジメチル塩化アンモニウム化合物、塩化セチルピリジウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンザルコニウムのようなハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物、塩化ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム、塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム、臭化ベンジルドデシルジメチルアンモニウム、四塩化ヨウ素酸ベンジルトリメチルヘキサデシルアンモニウム、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、臭化ドデシルエチルジメチルアンモニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、エチルヘキサデシルジメチルアンモニウム、Girard試薬 T、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－ポリオキシエチレン（１０）－Ｎ－タロウ－１，３－ジアミノプロパン、臭化ソンゾニウム、臭化トリメチル（テトラデシル）アンモニウム、１，３，５－トリアジン－１，３，５（２Ｈ，４Ｈ，６Ｈ）－トリエタノール、１－デカナミニウム、Ｎ－デシル－Ｎ、Ｎ－ジメチル－、塩化物、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、２－（２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）クレゾスキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、２－（２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）フェノキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、アルキル１または２ベンジル－１－（２－ヒドロキシエチル）－２－イミダゾニウムクロライド、アルキルビス（２－ヒドロキシエチル）ベンジルアンモニウムクロライド、塩化アルキルデメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチル３，４，－ジクロロベンジルアンモニウム（１００％のＣ１２）、塩化アルキルジメチル３，４，－ジクロロベンジルアンモニウム（５０％のＣ１４、４０％のＣ１２、１０％のＣ１６）、塩化アルキルジメチル３，４－ジクロロベンジルアンモニウム（５５％のＣ１４、２３％のＣ１２、２０％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（１００％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（１００％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（４１％のＣ１４、２８％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（４７％のＣ１２、１８％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（５５％のＣ１６、２０％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（５８％のＣ１４、２８％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６０％のＣ１４、２５％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６１％のＣ１１、２３％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６５％のＣ１２、２５％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６７％のＣ１２、２４％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６７％のＣ１２、２５％のＣ１４）塩化、アルキルジメチルベンジルアンモニウム（９０％のＣ１４、５％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（９３％のＣ１４、５％のＣ１８）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム

、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（Ｃ１２－１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（Ｃ１２－１８）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルジメチルベンジルアンモニウム、臭化アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム（９０％のＣ１４、５％のＣ１６、５％のＣ１２）、臭化アルキルジメチルエチルアンモニウム（ダイズ油の脂肪酸中のアルキルおよびアルケニル混合グループ）、塩化アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム（６０％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルイソプロピルベンジルアンモニウム（５０％のＣ１２、３０％のＣ１４，１７％のＣ１６、３％のＣ１８）、塩化アルキルトリメチルアンモニウム（５８％のＣ１８、４０％のＣ１６，１％のＣ１４、１％のＣ１２）、塩化アルキルトリメチルアンモニウム（９０％のＣ１８、１０％のＣ１６）、塩化アルキルジメチル（エチルベンジル）アンモニウム（Ｃ１２－Ｃ１８）、塩化ジ－（Ｃ８－１０）－アルキルジメチルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ジアルキルメチルベンジルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化ジイソデシルジメチルアンモニウム、塩化ジオクチルジメチルアンモニウム、塩化ドデシルビス（２－ヒドロキシエチル）オクチル水酸化アンモニウム、塩化ドデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ドデシルカルバモイルメチルジネシルベンジルアンモニウム、塩化ヘプタデシルヒドロキシエチルイミダゾリニウム、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキシエチル）－ｓ－トリアジン、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキシエチル）－ｓ－トリアジン、塩化ミリスタコニウム（および）Quat RNIUM 14、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ヒドロキシプロピルアンモニウムクロライド重合体、塩化ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム１水和物、塩化オクチルデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチルドデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチフェノキシエトキシエチルジメチルベンジルアンモニウム、オキシジエチレンビス（塩化アルキルジメチルアンモニウム）、第四級アンモニウム化合物、ジココアルキルジメチル、塩化物、塩化トリメトキシシリープロピルジメチルオクタデシルアンモニウム、トリメトキシ第四級シリル、塩化トリメチルドデシルベンジルアンモニウム、これらの半合成誘導体、ならびにこれらの組合せ。

【０１５２】

カチオン性のハロゲンを含有している例示的な化合物としては、セチルピリジウムハロゲン化合物、セチルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物、セチルジメチルエチルアンモニウムハロゲン化合物、セチルジメチルベンジルアンモニウムハロゲン化合物、セチルトリブチルホスホニウムハロゲン化合物、ドデシルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物、またはテトラデシルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの特定の実施形態において、カチオン性のハロゲンを含有している好適な化合物としては、塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、塩化トリメチルアンモニウム、塩化セチルベンジルジメチルアンモニウム、臭化セチルピリジニウム（ＣＰＢ）、臭化セチルトリメチルアンモニウム（ＣＴＡＢ）、臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、臭化セチルトリブチルホスホニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、および臭化テトラデシルトリメチルアンモニウムが挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい実施形態において、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物はＣＰＣであるが、本発明の組成物はカチオン性を含んでいる特定の化合物を有している組成に限定されない。

【０１５３】

好適なアニオン性の界面活性剤としては、以下の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない；カルボン酸塩、硫酸塩、スルホン酸塩、リン酸塩、ケノデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸ナトリウム塩、コール酸、ウシ、または羊の胆汁、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、デオキシコール酸メチルエステル、ジギトニン、ジギトキシゲニン、Ｎ，Ｎ－ジメチルドデシルアミン　Ｎ－オキシド、ドクセートナトリウム塩、グリコケノデオキシコール酸ナトリウム塩、グリココール酸水和物、合成、グリココール酸ナトリウム塩、グリコデオキシコール酸１水和物、グリコデオキシコール酸ナトリウム塩、

グリコデオキシコール酸ナトリウム塩、グリコチオコール酸　３－硫酸２ナトリウム塩、グリコチオコール酸エチルエステル、Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム塩、Ｎ－ラウロイルサルコシン溶液、Ｎ－ラウロイルサルコシン溶液、硫酸リチウムドデシル、硫酸リチウムドデシル、硫酸リチウムドデシル、ルゴール溶液、Niaproof 4、Type 4、１－オクタンスルホン酸ナトリウム塩、１－ブタンスルホン酸ナトリウム、１－ヘプタンスルホン酸ナトリウム無水和物、１－ヘプタンスルホン酸ナトリウム無水和物、１－ヘプタンスルホン酸ナトリウム無水和物、１－ノナンスルホン酸ナトリウム、１－プロパンスルホン酸ナトリウム１水和物、２－ブロモエタンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム水和物、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム１水和物、ドデシル硫酸ナトリウム、ヘキサンスルホン酸ナトリウム無水和物、オクチル硫酸ナトリウム、ペンタンスルホン酸ナトリウム無水和物、タウロコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム塩、タウロデオキシコール酸ナトリウム塩１水和物、タウロハイオデオキシコール酸ナトリウム塩水和物、タウロリゾコール酸３－硫酸２ナトリウム塩、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム塩、Trizma（登録商標）ドデシル硫酸塩、TWEEN（登録商標） 80、ウルソデオキシコール酸、これらの半合成誘導体、およびこれらの組合せ。

【０１５４】

好適な両性の界面活性剤としては、以下の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない；Ｎ－アルキルベタイン、ラウリルアミドプロピルジメチルベタイン、アルキルジメチルグリシン酸塩、Ｎ－アルキルアミノプロピオン酸塩、最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPS、最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPS（SigmaUltra）、電気泳動用の最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPS、最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPSO、最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPSO（SigmaUltra）、電気泳動用の最小で９８％（ＴＬＣ）のCHAPSO、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩（SigmaUltra）、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩、３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルミリスチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩、３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデシルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩、３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルオクチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩、３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルパルミチルアンモニオ）プロパンスルホネート、これらの半合成誘導体、およびこれらの組合せ。

【０１５５】

本発明は、本明細書に開示されている界面活性剤に限定されない。本発明の組成物において有用なさらなる界面活性剤および界面活性物質は、参考資料（例えば、McCutheon's Volume 1: Emulsions and Detergents（North American Edition、2000）が挙げられるが、これに限定されない）および商業的な供給源に基づいて確認され得る。

【０１５６】

４．ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物

いくつかの実施形態において、エマルションは、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物をさらに含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、エマルションは、エマルションの総重量に基づいて、約０．５～１．０重量％のまたはそれ以上のハロゲンを含んでいる化合物を含んでいる（が、他の濃度が考慮されている）。好ましい実施形態において、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物は、油相とあらかじめ混合されることが好ましいが；ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物は、異なる組成におけるエマルション組成物との組合せにおいて供給され得ることが理解されるべきである。好適なハロゲンを含んでいる化合物は、塩化物イオン、フッ化物イオン、臭化物イオン、ヨード化物イオンを含んでいる化合物から選択され得る。好ましい実施形態において、好適なカチオン性のハロゲンを含有している化合物としては、セチルピリジニウムハロゲン化合物、セチルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物、セチルジメチルエチルアンモニウムハロゲン化合物、セチルジメチルベンジルアンモニウムハロゲン化合物、セチルトリブチルホスホニウムハロゲン化合物、ドデシルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物、またはテトラ

デシルトリメチルアンモニウムハロゲン化合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの特定の実施形態において、カチオン性のハロゲンを含んでいる好適な化合物としては、塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、塩化トリメチルアンモニウム、塩化セチルベンジルジメチルアンモニウム、臭化セチルピリジニウム（ＣＰＢ）、臭化セチルトリメチルアンモニウム（ＣＴＡＢ）、臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、臭化セチルトリブチルホスホニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、および臭化テトラデシルトリメチルエチルアンモニウムが挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい実施形態において、ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物はＣＰＣであるが、本発明の組成物はカチオン性を含んでいる任意の特定の化合物を有している組成に限定されない。

【０１５７】

５．発芽促進剤

本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、発芽促進剤をさらに含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、エマルションは、約１ｍＭ～１５ｍＭ、より好ましくは約５ｍＭ～１０ｍＭの１つ以上の発芽促進化合物を含んでいる（が、他の濃度が考慮される）。好ましい実施形態において、発芽促進化合物は、エマルションの形成前に水相に供給される。本発明は、発芽促進剤がナノエマルション組成物に加えられている場合に、ナノエマルションの殺胞子性の特性が促進されることを考慮している。本発明は、さらに、そのような発芽促進剤は、中性のｐＨ（ｐＨ６～８、好ましくは７）付近において殺胞子活性を示すことをさらに考慮している。そのような中性のｐＨのエマルションは、例えばリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を用いて希釈すること、または中性のエマルションの調製によって入手され得る。ナノエマルションの殺胞子活性は、胞子が発芽するときに選択的に生じる。

【０１５８】

特定の実施形態において、本発明のワクチンに使用されるエマルションが殺胞子活性を有していることが示された。本発明は任意の特定の機序に限定されず、機序の理解は本発明の実施に必要ではないが、エマルションの膜融合性の成分が発芽の開始に対して作用し、栄養性の形態への転換が完了する前に、エマルションの溶原性の成分が新たに発芽する胞子を溶解させる作用を示すと考えられている。したがって、これらのエマルションの成分は、エマルションによる破壊に対して感受性を示す状態に胞子を明確に留めておくように作用する。発芽促進剤の添加は、例えば殺胞子活性が生じる速度を向上させることによって、エマルションの抗殺胞子活性を促進する。

【０１５９】

細菌性の内生胞子および菌類の胞子の発芽は、増強された代謝、ならびに熱および化学反応物質への低下した耐性と関連付けられている。発芽の発生には、胞子が環境が生長および再生産を十分に支持することを認識する必要がある。アミノ酸Ｌ－アラニンは細菌の胞子発芽を刺激する（例えばHills, J. Gen. Micro. 4:38 (1950); and Halvorson and Church, Bacteriol Rev. 21:112 (1957)を参照すればよい）。また、Ｌ－アラニンおよびＬ－プロリンは、真菌の胞子発芽を惹起すると報告されている（Yanagita, Arch Mikrobiol 26:329 (1957)）。単純なα－アミノ酸（例えばグリシンおよびＬ－アラニン）は、代謝の中心的な位置を占めている。α－アミノ酸のアミノ転移または脱アミノ化は、代謝および生育に必要とされる糖原性もしくはケト原性の炭化水素、ならびに窒素を生じる。例えば、Ｌ－アラニンのアミノ転移または脱アミノ化は、解糖代謝（Emnlen-Meyerhof経路）の最終産物であるピルビン酸塩を生じる。ピリビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によるピルビン酸塩の酸化は、アセチル－ＣｏＡ、ＮＡＤＨ、H^+、およびCO_2をもたらす。アセチル－ＣｏＡは、ミトコンドリア性の電子伝達連鎖を順に与える、トリカルボン酸回路（クレブス回路）の開始基質である。また、アセチル－ＣｏＡは、脂肪酸合成およびステロール合成の基本的な炭素源である。単純なα－アミノ酸は、発芽およびそれに続く代謝活性に要求される窒素、CO_2、糖原性および／またはケト原性の等価物を供給し得る。

【０１６０】

特定の実施形態において、発明の好適な発芽促進剤としては、グリシンを含んでいるア

ミノ酸、ならびにアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リジン、フェニルアラニン、チロシンおよびこれらのアルキルエステルのＬ－エナンチオマーが挙げられるが、これらに限定されない。発芽に対するアミノ酸の影響のさらなる情報は、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第５，５１０，１０４号に見出され得る。また、いくつかの実施形態において、グルコース、フルクトース、アスパラギン、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）、塩化アンモニウム（NH_4Cl）、塩化カルシウム（$CaCl_2$）、および塩化カリウム（ＫＣｌ）の混合物が使用され得る。本発明の特に好ましい実施形態において、組成物は、発芽促進剤であるＬ－アラニン、$CaCl_2$、イノシンおよびNH_4Clを含んでいる。いくつかの実施形態において、組成物は、それ自身が発芽促進剤および緩衝液を含み得るか、または含み得ない成長培地（例えばトリプチカーゼダイズ培地など）の通常の１つ以上の形態を含んでいる。

【０１６１】

上述の化合物は単に例示的な発芽促進剤であり、公知の他の発芽促進剤は、本発明のいくつかの実施形態に利用されるナノエマルションにおける用途について見出されることが理解される。発芽促進剤の候補物は、本発明の組成物への包含のための２つの基準を満す必要がある：それは、本明細書に開示されているエマルションと会合可能であること、および本明細書に開示されているエマルションに組み込まれたときに標的の胞子が発芽する速度を向上させることである。当業者は、特定の因子が発芽促進剤として作用する所望の機能を有しているか否かを、以下の２つによって決定し得る。（１）本明細書に開示されているナノエマルションとの組合せにおける当該因子の使用、および（２）上記組合せによって接触させたときの標的の不活性化と、当該因子なしの本発明の組成物によって類似の標的の不活性化との比較。

【０１６２】

さらなる他の実施形態において、中性のエマルション組成物に対する発芽促進剤（または成長培地）の添加は、本発明のワクチン組成物における使用にとって、エンベロープウイルス、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌に加えて、細菌性の胞子の不活性化に有効な組成物をもたらす。

【０１６３】

６．相互作用促進剤

さらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、標的の病原体（例えば、Vibrio、Salmonella、Shigella およびPseudomonasといったグラム陰性細菌の細胞壁）との、組成物の相互作用を向上可能な１つ以上の化合物（例えば相互作用促進剤）を含んでいる。好ましい実施形態において、相互作用促進剤は、油相とあらかじめ混合されることが好ましいが；他の実施形態において、相互作用促進剤は、乳化後の組成物と組み合わせて供給される。好ましいある実施形態において、相互作用促進剤は、キレート剤（例えば、緩衝液（例えばトリス緩衝液）におけるエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）またはエチレンビス（オキシエチレンニトリロ）テトラ酢酸（ＥＧＴＡ））である。キレート剤は、例示的な相互作用を促進する化合物にすぎないことが理解される。実際に、本発明いくつかの実施形態において使用されるナノエマルションの、微生物の因子および／または病原体との相互作用を向上させる他の因子が考慮されている。特に好ましい実施形態において、相互作用促進剤は約５０～約２５０μＭの濃度である。当業者は、特定の因子が相互作用促進剤として作用する所望の機能を有しているか否かを以下の２つによって決定可能である。（１）本発明の組成物との組合せにおける当該因子の標的に対する使用、および（２）上記組合せによって接触させたときの標的の不活性化と、当該因子なしの本発明の組成物によって類似の標的の不活性化との比較。因子の非存在におけるパラメータと比べて、細菌とのエマルションの相互作用を向上させ、これによって細菌の成長を減退させるか、または阻害する任意の因子薬剤は相互作用促進剤と見なされる。

【０１６４】

いくつかの実施形態において、ナノエマルションに対する相互作用促進剤の添加は、本発明のワクチンの組成物における使用のための、エンベロープウイルス、いくつかのグラ

ム陽性細菌、およびグラム陰性細菌の不活性化に有効な組成物を生成する。

【０１６５】

７．第四級アンモニウム化合物

いくつかの実施形態において、本発明のナノエマルションは、第四級アンモニウムを含有している化合物を含んでいる。例示的な第四級アンモニウム化合物としては、以下の化合物が挙げられるが、これらに限定されない；塩化アルキルメチルベンジルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウムおよび塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ヒドロキシプロピルアンモニウム塩化物重合体、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム１水和物、塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキシエチル）－ｓ－トリアジン、塩化ミリスタコニウム（および）ＱｕａｔＲＮＩＵＭ １４、塩化アルキルビス（２－ヒドロキシエチル）ベンジルアンモニウム、塩化アルキルデメチルベンジルアンモニウム、アルキルジメチル３，４－ジクロロベンジルアンモニウム、塩化ジメチルベンジルアンモニウム、アルキルジメチルベンジルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルジメチ（dimethy）ベンジルアンモニウム、臭化アルキルジメチルエチルアンモニウム、臭化アルキルジメチルエチルアンモニウム、塩化アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルイソプロピルベンジルアンモニウム、塩化アルキルトリメチルアンモニウム、塩化アルキル１または３ベンジル－１－（２－ヒドロキシエチル）－２－イミダゾリニウム、塩化ジアルキルメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）クレゾスキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）フェノキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジル塩化アンモニウムクロライド、塩化ジオクチルジメチルアンモニウム、塩化ドデシルビス（２－ヒドロキシエチル）オクチル水酸化アンモニウム、塩化ドデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ドデシルカルバモイルメチルジネシルベンジルアンモニウム、ヘプタデシルヒドロキシエチルイミダゾリニウム、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキシエチル）－ｓ－トリアジン、塩化オクチルデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチルドデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチフェノキシエトキシエチルジメチルベンジルアンモニウム、オキシジエチレンビス（塩化アルキルジメチルアンモニウム）、第四級アンモニウム化合物、ジココアルキルジメチル、塩化物、塩化トリメトキシシリープロピルジメチルオクタデシルアンモニウム、トリメトキシ第四級シリル、および塩化トリメチルドデシルベンジルアンモニウム。

【０１６６】

８．他の成分

いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、ナノエマルションに所望される特性または機能性を付与する１つ以上の付加的な成分を含んでいる。これらの成分は、ナノエマルションの水相または油相に組み込まれ得るか、および／また乳化の前または後に添加され得る。例えば、いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、フェノール（例えばトリクロサン、フェニルフェノール）、酸化剤（例えばクエン酸（例えば、１．５～６％）、酢酸、レモンジュース）、アルキル化剤（例えば水酸化ナトリウム（例えば０．３％））、緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、および特定のｐＨを維持するために有効な他の緩衝液）、およびハロゲン（例えばポリビニルピロロリドン、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素）をさらに含んでいる。

【０１６７】

ナノエマルションを生成する例示的な技術（例えば病原体の不活性化および／または本発明の免疫原性組成物の生成のために使用される）について、以下に説明されている。さ

らにまた、例示的な特定の調合法が以下に説明されている。

【０１６８】

（調合手法）

本発明のナノエマルションは、標準的なエマルション形成技術を用いて形成され得る。要約すると、水中油ナノエマルションを得るための相対的に高いせん断力の下（例えば高油圧および機械的な力を用いて）に、油相は水相と混合される。エマルションは、油相を水相と混合することによって、油相：水相の約１：９～５：１、好ましくは約５：１～３：１、最も好ましくは４：１の容積対容積に基づく範囲において、油相を水相に混合する。油相および水相は、エマルションを形成するために十分なせん断力を生成可能な任意の装置（例えば、フレンチプレスまたは高せん断のミキサー（例えばAdmix, Inc., Manchester, NHが提供している、例えばＦＤＡに承認された高分断ミキサーが利用可能である））を用いて混合され得る。そのようなエマルションを生成する方法は、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第５，１０３，４９７号および米国特許第４，８９５，４５２号に記載されている。

【０１６９】

好ましい実施形態において、本発明の方法に使用される組成物は、連続的な水性の相（例えば水）に分散されている不連続な油相の液滴を含んでいる。水のような水性の持続性の層中に分散された油性の非持続性の層の小滴を含んでいる。好ましい実施形態において、本発明のナノエマルションは、安定であり、長い貯蔵期間（例えば１年間またはそれ以上）の後にも変質しない。さらに、いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、抗原（例えば病原体）との組合せの後（例えばいくつかの実施形態において、３ヶ月間を超える期間、いくつかの実施形態において、６ヶ月間を超える期間、いくつかの実施形態において、１２ヶ月間を超える期間、いくつかの実施形態において、１８ヶ月間を超える長い期間）に、安定である。好ましい実施形態において、本発明のナノエマルションは、対象に投与される（例えば粘膜表面への噴霧または接触を介するか、嚥下されるか、吸入されるなど）ときに無毒であり、安全である。

【０１７０】

いくつかの実施形態において、エマルションの一部は、脂質構造（単層、複層および多層の脂質小胞、ミセル、ならびにラメラ相が挙げられるが、これらに限定されない）の形態であり得る。

【０１７１】

本発明のいくつかの実施形態は、エタノールを含んでいる油相を用いる。例えば、いくつかの実施形態において、本発明のエマルションは、（ｉ）水相、（ｉｉ）有機溶媒としてエタノールを含んでいる油相および必要に応じて発芽促進剤、ならびに（ｉｉｉ）界面活性剤としてTYLOXAPOL（好ましくは２～５％、より好ましくは３％）を含んでいる。この組成は、病原体の不活性化のために非常に有効であり、哺乳類の対象にとって無刺激であり、無毒である（例えば、したがって粘膜表面への投与に使用され得る）。

【０１７２】

いくつかの他の実施形態において、本発明のエマルションは、第２のエマルションにおいて乳化された第１のエマルションを含んでおり、ここで、（ａ）第１のエマルションは、（ｉ）水相および（ｉｉ）油および有機溶媒を含む油相、および（ｉｉｉ）界面活性剤を含んでおり、および（ｂ）第２のエマルションは、（ｉ）水相、（ｉｉ）油および陽イオン含有化合物を含んでいる油相、ならびに（ｉｉｉ）界面活性剤を含んでいる。

【０１７３】

（例示的な調合物）

以下の記載は、組成物ＢＣＴＰおよびX_8W_{60}ＰＣのための調合物を含んでいる例示的な多くのエマルションを示している。ＢＣＴＰは、油中水ナノエマルションを含んでおり、油相は、８０％の水におけるダイズ油、トリ－ｎ－ブチルリン酸塩、およびTRITON X-100から作製されている。X_8W_{60}ＰＣは、W_{80}８Ｐと等量のＢＣＴＰの混合物を含んでいる。W_{80}８Ｐは、グリセロールモノステアリン酸、TWEEN 60、ダイズ油、カチオ

ン性のハロゲンを含有しているＣＰＣ、およびはっか油から作製されるリポソーム様化合物であり、精製されたオヤ（oya）ステロールである（例えばGENEROLステロール）。GENEROLファミリーは、ポリエトキシ化されたダイズステロールの一群である（Henkel Corporation, Ambler, Pennsylvania）。本発明にとって有用な例示的なエマルションの調合物が表１Ｂに示されている。これらの特定の調合物は、それぞれ参照によってその全体が本明細書に援用される、米国特許第５，７００，６７９号（ＮＮ）；米国特許第５，６１８，８４０号；米国特許第５，５４９，９０１号（W_{80}８Ｐ）；および米国特許第５，５４７，６７７号に見られ得る。

【０１７４】

X_8W_{60}ＰＣエマルションは、W_{80}８ＰエマルションおよびＢＣＴＰエマルションを個別にまず作製するによって製造される。それから、これらの２つのエマルションの混合物はふたたび乳化されて、X_8W_{60}ＰＣと名づけた新たなエマルション組成物を生成する。そのようなエマルションを生成する方法は、それぞれ参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第５，１０３，４９７号および米国特許第４，８９５，４５２号に記載されている。

【０１７５】

【表３】

表1B

	油相の配合	油相 対 水の割合(容積/容積)
BCTP	1容積のﾄﾘ(N-ﾌﾞﾁﾙ)ﾘﾝ酸塩 1容積のTRITON X-100 8容積のﾀﾞｲｽﾞ油	4:1
NN	86.5gのﾓﾉｵﾚｲﾝ酸ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ 60.1mlのﾉﾉｷｼﾉｰﾙ-9 24.2gのGENEROL 122 3.27gの塩化ｾﾁﾙﾋﾟﾘｼﾞﾆｳﾑ 554gのﾀﾞｲｽﾞ油	3:1
W_{80}8P	86.5gのﾓﾉｵﾚｲﾝ酸ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ 21.2gのﾎﾟﾘｿﾙﾍﾞｰﾄ 60 24.2gのGENEROL 122 3.27gの塩化ｾﾁﾙﾋﾟﾘｼﾞﾆｳﾑ 4mlのはっか油 554gのﾀﾞｲｽﾞ油	3.2:1
SS	86.5gのﾓﾉｵﾚｲﾝ酸ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ 21.2gのﾎﾟﾘｿﾙﾍﾞｰﾄ60 24.2gのGENEROL 122 3.27gの塩化ｾﾁﾙﾋﾟﾘｼﾞﾆｳﾑ 554gのﾀﾞｲｽﾞ油	3.2:1 (水における1%のﾋﾞｽﾏｽ)

【０１７６】

上述した組成物は、例示に過ぎず、当業者は、本発明の目的にとって好適なナノエマルション組成物に到るために量を変更可能である。当業者は、水に対する油相の割合、なら

びに個々の油状の担体、界面活性剤ＣＰＣおよび有機リン酸緩衝液、それぞれの組成物の成分の割合が変動し得ることを理解する。

【０１７７】

ＢＣＴＰを含んでいる特定の組成物は油に対する水の割合が４：１であり、ＢＣＴＰは幾分かの水相を有するように調合され得る。例えば、いくつかの実施形態において、油相のそれぞれの部分に対して３、４、５、６、７、８、９または１０以上の部分の水相がある。同じことがW_{80}８Ｐに該当する。同様に、トリ（Ｎ－ブチル）リン酸塩：TRITON X-100：ダイズ油の割合は変更され得る。

【０１７８】

表１Ｂは、単なる例示であるW_{80}８Ｐにとっての特定の量のグリセロールモノオレイン酸塩、ポリソルベート　６０、GENEROL 122、塩化セチルピリジニウム、およびの担体油を示している。W_{80}８Ｐの特性を有しているエマルションは、異なる濃度のこれらの成分のそれぞれ、または同じ機能を満たす実質的に異なる成分を有しているように調合され得る。例えば、エマルションは、初期の油相において約８０～約１００ｇのグリセロールモノオレイン酸塩を有し得る。他の実施形態において、エマルションは、初期の油相において約１５～約３０ｇのポリソルベートを有し得る。さらなる他の実施形態において、組成物は、初期の油相において約２０～約３０ｇのGENEROLステロールを有し得る。

【０１７９】

ナノエマルションの個々の成分（例えば本発明の免疫原の組成物における）は、病原体を不活性化すること、およびエマルションの無毒性をもたらすことの任意のためにも作用し得る。例えば、ＢＣＴＰの活性成分であるTRITON－Ｘ１００は、１１％のＢＣＴＰと等価な濃度において、ウイルスのより低い不活性化能を有している。界面活性剤および溶媒に対する油相の添加は、同じ濃度における組織培養物におけるこれらの因子の毒性を顕著に低下させる。任意の理論に縛られることなく（機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の機序に限定されない）、ナノエマルションは、その成分の、病原体との相互作用を促進し、これによって、病原体の不活性化を容易に、個々の成分の毒性を低下させることが示唆されている。さらに、ＢＣＴＰのすべての成分が、ナノエマルションの構造においてではなく、１つの組成物において組み合わせられているとき、混合物は、その成分がナノエマルションの構造において組み合わせられている場合ほどに病原体の不活性化に有効ではない。

【０１８０】

類似の組成を有している調合物に分けて示されている種々の実施形態の多くが、以下に示されている。以下の組成物は、活性成分の種々の割合および混合物を説明している。以下に挙げられている調合物が例示であること、およびさらなる調合物が近い比率の範囲の成分を含んでいるさらなる調合物が本発明の範囲内にあることを、当業者は理解する。

【０１８１】

本発明の特定の実施形態において、ナノエマルションは、約３～８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油）、約１５～２５容積％の水相（例えばDiH_2OまたはＰＢＳ）、およびいくつかの組成では、１容積％の未満のＮａＯＨを含んでいる。これらの実施形態のいくつかはＰＢＳを含んでいる。これらのいくつかの実施形態における１規定のＮａＯＨおよび／またはＰＢＳの添加は、約７．０～約９．０、より好ましくは約７．１～８．５の範囲のｐＨが実現されるように、ユーザが調合物のｐＨを好都合に調節することを可能にすることが考慮されている。

例えば、本発明のある実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油および約２４容積％のDiH_2Oを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣと表わされる）。類似の他の実施形態は、約３．５容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油および約２３．５容積％のDiH_2Oを含んでいる（本明細書においてＹ３．５ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノ

ール、約１容積％のＣＰＣ、調合物のｐＨを約７．１にする０．０６７容積％の１規定のＮａＯＨ、約６４容積％のダイズ油、約２３．９３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣ　ｐＨ７．１と表わされる）。さらなる他の実施形態は、約３容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、調合物のｐＨを約８．５にする０．６７容積％の１規定のＮａＯＨ、約６４容積％のダイズ油、約２３．３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＥＣ　ｐＨ８．５と表わされる）。さらに類似の他の実施形態は、約４容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ４ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態は、約８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ８ＥＣと表わされる）。さらなる実施形態は、約８容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約１９容積％の１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書においてＹ８ＥＣ・ＰＢＳと表わされる）。

【０１８２】

本発明のいくつかの実施形態において、発明されたナノエマルションは、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、約２７容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる（本明細書においてＥＣと表わされる）。

【０１８３】

いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、約８容積％のトリブチルリン酸（ＴＢＰ）、および約６４容積％の油（例えばダイズ油）、および約２０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる（本明細書においてＳ８Ｐと表わされる）。

【０１８４】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約１～２容積％のTRITON X-100、約１～２容積％のTYLOXAPOL、約７～８容積％のエタノール、約１容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約６４～５７．６容積％の油（例えばダイズ油）、約２３容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの調合物のいくつかは、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、および約１０ｍＭの塩化アンモニウムを含んでいる。これらの調合物のいくつかはＰＢＳを含んでいる。これらの実施形態のいくつかにおいて、ＰＢＳの添加は、ユーザが調合物のｐＨを好都合に調節することを可能にすることを意図している。例えば、本発明の一実施形態は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる。他の実施形態において、調合物は、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLOXAPOL、約７．２容積％のエタノール、約０．９容積％の塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、および約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５７．６容積％のダイズ油、残部の１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＥＣ/ＧＥと表わされる）。

【０１８５】

本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約５容積％以上のTWEEN 80、約８容積％以上のエタノール、約１容積％以上のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{80}$５ＥＣと表わされる）。

【０１８６】

本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約５容積％以上のTWEEN 20、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、および約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{20}$５ＣＥと表される）。

【０１８７】
本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約２～８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～２５容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。例えば、本発明は、約２容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる調合物（本明細書においてＸ２Ｅと表わされる）を意図している。類似の他の実施形態において、ナノエマルションは、約３容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ３Ｅと表わされる）。さらなる他の実施形態において、調合物は、約４容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ４Ｅと表わされる）。さらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約５容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ５Ｅと表わされる）。いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約６容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ６Ｅと表わされる）。さらなる実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｅと表わされる）。さらなる実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約６４容積％のオリーブ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｅ　Ｏと表わされる）。さらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のエタノール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＥＣと表わされる）。
【０１８８】
本発明の代替的な実施形態において、ナノエマルションは、約１～２容積％のTRITON X-100、約１～２容積％のTYLPXAPOL、約６～８容積％のＴＢＰ、約０．５～１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ）、および約３５容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらのナノエマルションの一部は、約１～５容積％のトリプチカーゼダイズ培地、約０．５～１．５容積％の酵母抽出物、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、および約２０～４０容積％の液体調製粉乳を含んでいる。液体調製粉乳を含んでいるいくつかの実施形態において、調合物は、カゼイン加水分解物（例えばNeutramigenおよびProgestimilなど）を含んでいる。これらの実施形態のいくつかにおいて、ナノエマルションは、約０．１～１．０容積％のチオ硫酸ナトリウム、および約０．１～１．０容積％のクエン酸ナトリウムをさらに含んでいる。これらの基本の成分を含んでいる類似の実施形態は、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を水相として用いている。例えば、ある実施形態は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ２ＥＣと表わされる）。さらなる他の実施形態において、発明に係る調合物は、約２容積％のTRITON X-100、約２容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約０．９容積％のチオ硫酸ナトリウム、約６４容積％のダイズ油、および約２３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ２ＰＣ　ＳＴＳ１と表わされる）。類似の他の実施形態において、ナノエマルションは、約１．７容積％のTRITON X-100、約１．７容積％のTYLPXAPOL、約６．８容積％のＴＢＰ、約０．８５容積％のＣＰＣ、約２９．２容積％のNEUTRAMIGEN、約５４．４容積％のダイズ油、および約４．９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において８５容積％のＸ２Ｙ２ＰＣ／ｂａｂｙと表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％

のＣＰＣ、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５７．６容積％のダイズ油、および残部の容積％の０．１×ＰＢＳを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＰＣ／ＧＥと表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％のＣＰＣ、約３容積％のトリプチカーゼダイズ培地、約５ｍＭのＬ－アラニン／イノシン、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５７．６容積％のダイズ油、および約２７．７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＰＣ／ＴＳＢと表わされる）。本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約１．８容積％のTRITON X-100、約１．８容積％のTYLPXAPOL、約７．２容積％のＴＢＰ、約０．９容積％のＣＰＣ、約１容積％の酵母溶出物、約５７．６容積％のダイズ油、および約２９．７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において９０％　Ｘ２Ｙ２ＰＣ／ＹＥと表わされる）。

【０１８９】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約３容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。本発明の特定の実施形態において、ナノエマルションは、約３容積％のTRITON X-100、約３容積％のTYLPXAPOL、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ、および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ３ＰＣと表わされる）。

【０１９０】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約４～８容積％のTRITON X-100、約５～８容積％のＴＢＰ、約３０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約０～３０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの特定の実施形態は、さらに、約１容積％のＣＰＣ、約１容積％の塩化ベンザルコニウム、約１容積％の臭化セチルイリジウム、約１容積％の臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、５００μＭのＥＤＴＡ、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５ｍＭのイノシン、および約５ｍＭのＬ－アラニンを含んでいる。例えば、これらの特定の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐと表わされる）。他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣと表わされる）。本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約５０容積％のダイズ油、および約３３％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＡＴＢ－Ｘ１００１と表わされる）。他の実施形態において、発明の組成物は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約２容積％のＣＰＣ、約５０容積％のダイズ油、および約３２％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＡＴＢ－Ｘ００２と表わされる）。他の実施形態において、ナノエマルションは、約４容積％のTRITON X-100、約４容積％のＴＢＰ、約０．５容積％のＣＰＣ、約３２容積％のダイズ油、および約５９．５％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書において５０％　Ｘ８ＰＣと表わされる）。いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約０．５容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１９．５容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ$_{1/2}$と表わされる）。本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約２容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約１８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ２と表わされる）。他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の塩化ベンザルコニウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐ

ＢＣと表わされる）。本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の臭化セチルイリジウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣＰＢと表わされる）。本発明の例示的な他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％の臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、約５０容積％のダイズ油、および約３３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐ　ＣＴＡＢと表わされる）。本発明のさらなる実施形態において、本発明は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約５００μＭＥＤＴＡ、約６４容積％のダイズ油、および約１５．８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＰＣ　ＥＤＴＡと表わされる）。いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約１０ｍＭの塩化アンモニウム、約５ｍＭのイノシン、約５ｍＭのＬ－アラニン、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｐ　ＧＥ$_{1\ X}$と表わされる）。本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約５容積％のTRITON X-100、約５容積％のＴＢＰ、約１容積％のＣＰＣ、約４０容積％のダイズ油および約４９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ５Ｐ$_5$Ｃと表わされる）。

【０１９１】

本発明のさらなる実施形態において、ナノエマルションは、約２容積％のTRITON X-100、約６容積％のTYLOXAPOL、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ２Ｙ６Ｅと表わされる）。

【０１９２】

本発明のさらなる実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～２５容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。特定のナノエマルション組成物（例えば免疫応答の生起に使用された）は、約１容積％のＬ－アスコルビン酸をさらに含んでいる。例えば、ある特定の実施形態は、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｇと表わされる）。さらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のグリセロール、約１容積％のＬ－アスコルビン酸、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８ＧＶ$_C$と表わされる）。

【０１９３】

さらなる実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、０．５～０．８容積％のTWEEN 60、約０．５～２．０容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～２５容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。例えば、ある特定の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、０．７容積％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約１８．３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｗ６０ＰＣ$_1$と表わされる）。いくつかのの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、０．７１容積％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約１８．２９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ６０$_{0.7}$Ｘ８ＰＣと表わされる）。他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、０．７容積％のTWEEN 60、約０．５容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４～７０容積％のダイズ油、および約１８．８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＸ８Ｗ６０ＰＣ$_2$と表わされる）。さらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のTRITON X-100、０．７１容積％のTWEEN 60、約２容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約１７．３容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる。本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約０．７１容積

％のTWEEN 60、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油および約２５．２９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ６０$_{0.7}$ＰＣと表わされる）。

【０１９４】

本発明の他の実施形態において、ナノエマルションは、約６０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約２０～３０容積％の水相（例えばＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）に加えて、約２容積％のジオクチルスルホスクシネート、ならびに約８容積％のグリセロールまたは約８容積％のＴＢＰのいずれか、を含んでいる。例えば、いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約６４容積％のダイズ油および約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏに加えて、約２容積％のジオクチルスルホスクシネート、ならびに約８容積％のグリセロールを含んでいる（本明細書においてＤ２Ｇと表わされる）。本発明の関連する他の実施形態において、ナノエマルションは、約２容積％のジオクチルスルホスクシネート、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約２６容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＤ２Ｐと表わされる）。

【０１９５】

本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約８～１０容積％のグリセロール、約１～１０容積％のＣＰＣ、約５０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、特定の実施形態において、ナノエマルションは約１容積％のＬ－アスコルビン酸をさらに含んでいる。例えば、いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のグリセロール、約１容積％のＣＰＣ、約６４容積％のダイズ油、および約２７容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣと表わされる）。いくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約１０容積％のグリセロール、約１０容積％のＣＰＣ、約６０容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣ１０と表わされる）。本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約１０容積％のグリセロール、約１容積％のＣＰＣ、約１容積％のＬ－アスコルビン酸、約６４容積％のダイズまたは油、および約２４容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＧＣＶ$_C$と表わされる）。

【０１９６】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約８～１０容積％のグリセロール、約８～１０容積％のＳＤＳ、約５０～７０容積％の油（例えばダイズ油またはオリーブ油）、および約１５～３０容積％の水相（ＤｉＨ$_2$ＯまたはＰＢＳ）を含んでいる。さらに、これらの特定の実施形態において、ナノエマルションは、約１容積％のレクチン、および約１容積％のｐ－ヒドロキシベンゼン酸メチルエステルをさらに含んでいる。そのような調合物の例示的な実施形態は、約８容積％のＳＤＳ、約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳ８Ｇと表わされる）。関連する調合物は、約８容積％のグリセロール、約８容積％のＳＤＳ、約１容積％のレクチン、および約１容積％のｐ－ヒドロキシベンゼン酸メチルエステル、約６４容積％のダイズ油、および約１８容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳ８ＧＬ１Ｂ１と表わされる）。

【０１９７】

本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約４容積％のTWEEN 80、約４容積％のTYLOXAPOL、約１容積％のＣＰＣ、約８容積％のエタノール、約６４容積％のダイズ油、および約１９容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＷ$_{80}$４Ｙ４ＥＣと表わされる）。

【０１９８】

本発明のいくつかの実施形態において、ナノエマルションは、約０．０１容積％のＣＰＣ、約０．０８容積％のTYLOXAPOL、約１０容積％のエタノール、約７０容積％のダイズ油、および約１９．９１容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＹ．０８ＥＣ．０１と表わされる）。

【０１９９】
本発明のさらなる他の実施形態において、ナノエマルションは、約８容積％のラウリル硫酸ナトリウム、約８容積％のグリセロール、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏを含んでいる（本明細書においてＳＬＳ８Ｇと表わされる）。
【０２００】
上述の特定の調合物は、本発明における使用（例えば病原体の不活性化するおよび／または中和、ならびに対象における免疫応答の生起（ワクチンとしての用途）のため）について見出されている種々のエマルションを示すための単なる例である。本発明は、上述した種々の調合物およびさらなるナノエマルションが本発明の方法における用途について見出されることを意図している。エマルションの候補物は、それらが好適であるか否かを決定するために容易に試験され得る。第１に、所望の成分は、エマルションが形成され得るか否かを決定するために、本明細書に記載の方法を用いて調製される。エマルションを形成不可能である場合に、候補物は不採用にされる。例えば、４．５％のチオ硫酸ナトリウム、０．５％のクエン酸ナトリウム、１０％のｎ－ブタノール、６４％のダイズ油、および２１％のＤｉＨ$_2$Ｏから作製される組成物の候補物は、エマルションを形成しない。
【０２０１】
第２に、好ましい実施形態において、エマルションの候補物は、安定なエマルションを形成すべきである。予定されている用途（例えば対象の免疫応答を生起すること）を可能にする十分な期間にわたってエマルションの形態を維持する場合に、エマルションは安定である。例えば、貯蔵、輸送などがなされるエマルションにとって、数ヶ月間から数年間にわたって組成物がエマルションの形態を維持することが所望され得る。相対的に不安定である典型的なエマルションは、一日以内に形態を損なう。例えば８％の１－ブタノール、５％のTWEEN 10、１％のＣＰＣ、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏから作製されている組成物の候補物は、安定なエマルションを形成しない。安定であることが示されているナノエマルションとしては、以下のナノエマルションが挙げられるが、これらに限定されない；約８容積％のTRITON X-100、約８容積％のＴＢＰ、約６４容積％のダイズ油、および約２０容積％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＸ８Ｐと表わされる）；約５容積％以上のTWEEN 80、約８容積％以上のエタノール、約１容積％以上のＣＰＣ、約６４容積％の油（例えばダイズ油）、約２２容積％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣと表わされる）；０．０８％のTRITON X-100、０．０８％のグリセロール、０．０１％の塩化セチルピリジニウム、９９％のバター、０．８３％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において１％　Ｘ８ＧＣ　Ｂｕｔｔｅｒと表わされる）；０．８％のTRITON X-100、０．８％のグリセロール、０．１％の塩化セチルピリジニウム、６．４％のダイズ油、１．９％のＤｉＨ$_2$Ｏ、および９０％のバター（本明細書において１０％　Ｘ８ＧＣ　Ｂｕｔｔｅｒと表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、１％の塩化セチルピリジニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の粘度７０のミネラル油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　７０　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、粘度３５０のミネラル油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　３５０　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）。いくつかの実施形態において、本発明のナノエマルションは、１週間以上、１ヵ月以上、または１年間以上にわたって安定である。
【０２０２】
第３に、エマルションの候補物は、予定されている用途にとって有効性を有している必要がある。例えば、ナノエマルションは、所望のレベル（例えば、１ログ、２ログ、３ログ、４ログ、．．．の低下）まで病原体を不活性化（例えば死滅または成長の阻害）する必要がある。本明細書に記載の方法を用いて、特定のエマルションの候補物の、所望の微生物に対する適合性を決定可能である。これは、好適な対照のサンプル（例えば水のような陰性対照）を用いた実験と並行した、１以上の期間にわたるエマルションに対する微生物のばくろ、ならびにエマルションが微生物を死滅させるか、または無力化するか否か、および死滅もしくは無力化に至る程度を決定することを一般的に含んでいる。例えば、１

％の塩化アンモニウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏから作製されている組成物の候補物は、有効なエマルションではないと示された。以下のエマルションの候補物は、本明細書に記載の方法を用いて有効であると示された；５％のTWEEN 20、５％の塩化セチルピリジウム、１０％のグリセロール、６０％のダイズ油、および２０％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣ５と表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、１０％のグリセロール、６４％のダイズ油、および２０％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のオリーブ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｏｌｉｖｅ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の亜麻仁油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｆｌａｘｓｅｅｄ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のコーン油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｒｎ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のココナッツ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｃｏｎａｔ　Ｏｉｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％の綿種油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｃｏｔｔｏｎ　Ｏｉｌと表わされる）；８％のデキストロース、５％のTWEEN 20、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　Ｄｅｘｔｒｏｓｅと表わされる）；８％のPEG 200、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　ＰＥＧ　２００と表わされる）；８％のメタノール、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　Ｍｅｔｈａｎｏｌと表わされる）；８％のPEG 1000、５％のTWEEN 10、１％の塩化セチルピリジウム、６４％のダイズ油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５Ｃ　ＰＥＧ　１０００と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のNatrosol 250H NF、および９６％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　２、２％　Ｗ２０５ＥＣ　ＧＥＬとも表される）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、１％のNatrosol 250H NF、および９７％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　１と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、３％のNatrosol 250H NF、および９５％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　３と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、０．５％のNatrosol 250H NF、および９７．５％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｎａｓｔｒｏｓｏｌ　０．５と表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のMethocel A、および９６％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％のＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｅｔｈｏｃｅｌ　Ａと表わされる）；２％のＷ$_{20}$５ＥＣ、２％のMethocel K、およびＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において２％　Ｗ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｅｔｈｏｃｅｌ　Ｋと表わされる）；２％のNatrosol、０．１％のＸ８ＰＣ、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、およびＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において０．１％　Ｘ８ＰＣ／ＧＥ＋２％　Ｎａｔｒｏｓｏｌと表わされる）；２％のNatrosol、０．８％のTRITON X-100、０．８％のトリブチルリン酸塩、６．４％のダイズ油、０．１％の塩化セチルピリジウム、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、およびＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において１０％　Ｘ８ＰＣ／ＧＥ＋２％のＮａｔｒｏｓｏｌと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のラード、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｌａｒｄと表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、８％のエタノール、６４％のミネラル油、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ　Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌと表わされる）；０．１％の塩化セチルピリジウム、２％のNerolidol、５％のTWEEN 20、１０％のエタノール、６４％のダイズ油、および２０．９％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ$_{0.1}$Ｎと表わさ

れる）；０．１％の塩化セチルピリジウム、２％のFarnesol、５％のTWEEN 20、１０％のエタノール、６４％のダイズ油、および２０．９％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ$_{0.1}$Ｆと表わされる）；０．１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN 20、１０％のエタノール、６４％のダイズ油、および２０．９％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＥＣ$_{0.1}$と表わされる）；１０％の塩化セチルピリジウム、８％のトリブチルリン酸塩、８％のTWEEN 20、５４％のダイズ油、および２０％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＸ８ＰＣ$_{10}$と表わされる）；５％の塩化セチルピリジウム、８％のTRITON-100、８％のトリブチルリン酸塩、５４％のダイズ油、および２０％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＸ８ＰＣ$_5$と表わされる）；０．０２％の塩化セチルピリジウム、０．１％のTWEEN-20、１０％のエタノール、７０％のダイズ油、および１９．８８％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$０．１ＥＣ$_{0.02}$と表わされる）；１％の塩化セチルピリジウム、５％のTWEEN－２０、８％のグリセロール、６４％のMobile 1、および２２％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書においてＷ$_{20}$５ＧＣ　Ｍｏｂｉｌｅ　１と表わされる）；７．２％のTRITON-100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、０．１×ＰＢＳ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、および２５．８７％のＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％　Ｘ８ＰＣ／ＧＥと表わされる）；７．２％のTRITON-100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、１％のＥＤＴＡ、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、０．１×ＰＢＳおよびＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％　のＸ８ＰＣ／ＧＥ　ＥＤＴＡと表わされる）；７．２％のTRITON-100、７．２％のトリブチルリン酸塩、０．９％の塩化セチルピリジウム、５７．６％のダイズ油、１％のチオ硫酸ナトリウム、５ｍＭのＬ－アラニン、５ｍＭのイノシン、１０ｍＭの塩化アンモニウム、０．１×ＰＢＳおよびＤｉＨ$_2$Ｏ（本明細書において９０％　Ｘ８ＰＣ／ＧＥ　ＳＴＳと表わされる）。

【０２０３】

本発明の好ましい実施形態において、ナノエマルションは、例えばヒト、植物または動物に対して、無毒であり、例えばヒト、植物または動物に対して、無刺激であり、例えばヒト、植物、動物または環境に対して、非腐食性であるが、広範な微生物（細菌、真菌、ウイルスおよび胞子が挙げられる）に対して有効性を有している。上述した多くのナノエマルションはこれらの適格性を満たしており、以下の記載は、無毒、無刺激、非腐食性、抗菌性である、本発明の好ましい多くのナノエマルション（本項目のこれ以降において「無毒性ナノエマルション」と記載する）を示している。

【０２０４】

いくつかの実施形態において、無毒性ナノエマルションは、細菌およびそれらの胞子、エンベロープウイルスならびに真菌に有効なである広範な抗菌剤としての使用のための、界面活性剤脂質調製物（ＳＬＰ）を含んでいる。好ましい実施形態において、これらのＳＬＰｓは、殺生活性を増強させる種々のイオンに加えて、油、界面活性物質、溶媒、およびハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物の混合物を含んでいる。これらのＳＬＰｓは、高い刺激性および／または毒性がある市販の殺菌剤および殺胞子剤に比べて、安定であり、無刺激であり、かつ無毒性の化合物と性質決定されている。

【０２０５】

無毒性ナノエマルションにおける使用のための成分としては、以下の成分が挙げられるが、これらに限定されない：界面活性物質（例えば、TRITON X-100（５～１５％）もしくはTRITONファミリーの他のメンバー、TWEEN 60（０．５～２％）もしくはTWEENファミリーの他のメンバー、またはTYLOXAPOL（１～１０％））；溶媒（すなわちトリブチルリン酸（５～１５％））、アルコール（例えばエタノール（５～１５％）またはグリセロール（５～１５％））；油（例えばダイズ油（４０～７０％））；ハロゲンを含んでいるカチオン性の化合物（例えば塩化ベンザルコニウム（０．５～２％）、Ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド（５ｍＭ～２００ｍＭ）、リン酸ナトリウム（１ｍＭ～２０ｍＭ））；ヌクレオシド（例えばイノシン（５０μＭ～２０ｍＭ））；およびアミノ

酸（例えばＬ－アラニン（５０μＭ～２０ｍＭ））。エマルションは、例えば、高分断ミキサーにおいて３～１０分間にわたって混合することによって調製される。エマルションは、混合の前に８２℃において１時間にわたって加熱され得るか、または加熱され得ない。

【０２０６】

本発明における使用のための第四級アンモニウム化合物としては、以下の化合物が挙げられるが、これらに限定されない；サッカリン酸Ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、１，３，５－トリアジン－１，３，５（２Ｈ，４Ｈ，６Ｈ）－トリエタノール、１－デカナミニウム、Ｎ－デシル－Ｎ、Ｎ－ジメチル－、塩化物、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、２－（２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）クレゾスキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジル塩化アンモニウム、２－（２－（２－（ｐ－（ジイソブチル）フェノキシ）エトキシ）エチルジメチルベンジル塩化アンモニウム、アルキル１または３ベンジル－１－（２－ヒドロキシエチル）－２－塩化イミダゾニウム、アルキルビス（２－ヒドロキシエチル）ベンジル塩化アンモニウム、アルキルデメチルベンジル塩化アンモニウム、アルキルジメチル３，４，－ジクロロベンジル塩化アンモニウム（１００％のＣ１２）、アルキルジメチル３，４，－ジクロロベンジル塩化アンモニウム（５０％のＣ１４、４０％のＣ１２、１０％のＣ１６）、アルキルジメチル３，４－ジクロロベンジル塩化アンモニウム（５５％のＣ１４、２３％のＣ１２、２０％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（１００％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（１００％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（４１％のＣ１４、２８％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（４７％のＣ１２、１８％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（５５％のＣ１６、２０％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（５８％のＣ１４、２８％のＣ１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６０％のＣ１６、２５％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６１％のＣ１１、２３％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６５％のＣ１２、２５％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６７％のＣ１２、２４％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（６７％のＣ１２、２５％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（９０％のＣ１４、５％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（９３％のＣ１４、４％のＣ１２）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（９５％のＣ１６、５％のＣ１８）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（および）塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（脂肪酸として）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（Ｃ１２～１６）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（Ｃ１２～１８）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化アルキルジメチルジメチルベンジルアンモニウム、臭化アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム（９０％のＣ１４、５％のＣ１６、５％のＣ１２）、臭化アルキルジメチルエチルアンモニウム（ダイズ油の脂肪酸中のアルキルおよびアルケニル混合グループ）、塩化アルキルジメチルエチルベンジルアンモニウム（６０％のＣ１４）、塩化アルキルジメチルイソプロピルベンジルアンモニウム（５０％のＣ１２、３０％のＣ１４，１７％のＣ１６、３％のＣ１８）、塩化アルキルトリメチルアンモニウム（５８％のＣ１８、４０％のＣ１６，１％のＣ１４、１％のＣ１２）、塩化アルキルトリメチルアンモニウム（９０％のＣ１８、１０％のＣ１６）、塩化アルキルジメチル（エチルベンジル）アンモニウム（Ｃ１２～Ｃ１８）、ジ－（Ｃ８－１０）－アルキルジメチルアンモニウムクロライド、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ジアルキルメチルベンジルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化ジイソデシルジメチルアンモニウム、塩化ジオクチルジメチルアンモニウム、塩化ドデシルビス（２－ヒドロキシエチル）オクチル水酸化アンモニウム、塩化ドデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ドデシルカルバモイルメチルジネシルベンジルアンモニウム、塩化ヘプタデシルヒドロキシエチルイミダゾリニウム、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキ

シエチル）－ｓ－トリアジン、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリス（２－ヒドロキシエチル）－ｓ－トリアジン、塩化ミリスタコニウム（および）Quat RNIUM 14、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ヒドロキシプロピルアンモニウムクロライド重合体、ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物１水和物、塩化オクチルデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチルドデシルジメチルアンモニウム、塩化オクチフェノキシエトキシエチルジメチルベンジルアンモニウム、オキシジエチレンビス（塩化アルキルジメチルアンモニウム）、第四級アンモニウム化合物、ジココアルキルジメチル、塩化物、塩化トリメトキシシリープロピルジメチルオクタデシルアンモニウム、トリメトキシ第四級シリル、塩化トリメチルドデシルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－ドデシルジメチルエチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－ヘキサデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ｎ－テトラデシルジメチルエチルベンジルアンモニウム、および塩化ｎ－オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム。

【０２０７】

好ましい無毒性ナノエマルションは、一般的に以下の点によって特徴付けられる：それらは、直径およそ２００～８００ｎｍである（が、より大きい直径およびより小さい直径である）；電荷は成分に依存している；それらは、それらの殺生活性を維持して、相対的に長期間（例えば２年間以下）にわたって安定である；それらは、界面活性剤および溶媒の毒性を顕著に低下させるそれらの油の含有物に少なくとも部分的に起因して、個々の成分と比べて、無刺激性および無毒である；それらは０．１％ほどの低濃度において有効である；それらは、無性細菌（グラム陽性菌およびグラム陰性菌）、真菌、ならびにエンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスのほとんどに対する１５分間における抗菌活性（例えば９９．９９％の死滅）を有している；それらは、発芽促進剤を用いて生成されている場合に１～４時間における殺胞子活性を有している（例えば９９．９９％の死滅）。

【０２０８】

Ｄ．動物モデル

いくつかの実施形態において、可能性のあるナノエマルション組成物（例えば免疫応答を生じるための（例えばワクチンとして使用するための））が、感染性疾患の動物モデルにおいて試験されている。十分に改良された動物モデルの使用によって、ヒトの対象への投与の前に、ワクチンの有効性および安全性を評価する方法がもたらされる。疾患の例示的な動物モデルは表３に示されている。これらの動物は、（例えばJackson Laboratories Charles River; Portage, MIから）市販されている。

【０２０９】

Bacillus cereus（Bacillus anthracisの近縁種である）を使用して、本発明のワクチンの炭疽菌ワクチンを試験する。両方の細菌は、胞子を形成するグラム陽性の桿菌であり、各細菌によって引き起こされる疾患の症候群のほとんどは、毒素産生に起因しており、感染した宿主に対するこれらの毒素の作用である（Brown et al., J. Bact., 75:499 (1958); Burdon and Wende, J. Infect Dis., 107:224 (1960); Burdon et al., J. Infect. Dis., 117:307 (1967)）。Bacillus cereus感染は、Bacillus anthracisによって引き起こされる疾患の症候群と類似の症状を呈する。マウスは、B. cereusの毒素の作用によって速やかに死亡すると報告されており、急性感染症にとって有用なモデルである。テンジクネズミは、炭疽菌の皮膚の形態と類似している、B. cereusによる皮下感染に続く皮膚損傷を呈する。

【０２１０】

マウスおよびテンジクネズミの両方におけるClostridium perfringens感染は、抗生物質のインビボ試験のためのモデル系として使用されている（Stevens et al., Antimicrob. Agents Chemother., 31:312 (1987); Stevens et al., J. Infect. Dis., 155:220 (1987); Alttemeier et al., Surgery, 28:621 (1950); Sandusky et al., Surgery, 28:632 (1950)）。Clostridium tetaniは、哺乳類の広範な種に感染し、疾患を引き起こすことがよく知られている。マウス、テンジクネズミおよびウサギのすべてが実験的に使用され

ている（Willis, Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Wilson, G., A. Miles, and M.T. Parker, eds. pages 442-475 1983）。

【０２１１】

マウス、テンジクネズミ、ブタおよびウサギにおけるVibrio cholerae感染は、首尾よく実現されている。公開された報告によれば、通常の腸管における細菌フローラを変えることが、これらの実験宿主において成立されるべき感染にとって好ましい。これは、通常の腸管における細菌フローラを抑制するための抗生物質の投与、およびいくつかの場合に動物に餌を与えないことによって実現されている（Butterton et al., Infect. Immun., 64:4373 (1996); Levine et al., Microbiol. Rev., 47:510 (1983); Finkelstein et al., J. Infect. Dis., 114:203 (1964); Freter, J. Exp. Med., 104:411 (1956); and Freter, J. Infect. Dis., 97:57 (1955)）。

【０２１２】

マウスおよびテンジクネズミにおけるShigella flexnerii感染は、首尾よく実現されている。ビブリオ感染の場合と同様に、通常の腸管における細菌フローラは、これらの実験宿主における感染の成立に役立てるために変更されることが好ましい。これは、これは、通常の腸管における細菌フローラを抑制するための抗生物質の投与、およびいくつかの場合に動物に餌を与えないことによって実現されている（Levine et al., Microbiol. Rev., 47:510 (1983); Freter, J. Exp. Med., 104:411 (1956); Formal et al., J. Bact., 85:119 (1963); LaBrec et al., J. Bact. 88:1503 (1964); Takeuchi et al., Am. J. Pathol., 47:1011 (1965)）。

【０２１３】

マウスおよびラットは、Salmonella typhimuriumおよびSalmonella enteriditiを用いた実験的な研究に広く使用されている（Naughton et al., J. Appl. Bact., 81:651 (1996); Carter and Collins, J. Exp. Med., 139:1189 (1974); Collins, Infect. Immun., 5:191 (1972); Collins and Carter, Infect. Immun., 6:451 (1972)）。

【０２１４】

マウスおよびラットは、センダイウイルス感染のための十分に確立された実験モデルである（Jacoby et al., Exp. Gerontol., 29:89 (1994); Massion et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9:361 (1993); Castleman et al., Am. J. Path., 129:277 (1987); Castleman, Am. J. Vet. Res., 44:1024 (1983); Mims and Murphy, Am. J. Path., 70:315 (1973)）。

【０２１５】

マウスのSindbisウイルス感染は、新生マウスの脳内接種によって一般的に実現される。代替的に、離乳したマウスは、足蹠において皮下に接種を受ける（Johnson et al., J. Infect. Dis., 125:257 (1972); Johnson, Am. J. Path., 46:929 (1965)）。

【０２１６】

動物は、輸送を終えてから３～５日間にわたって収容され、実験における使用のまえに新たな住環境に順化させられることが好ましい。各実験の開始において、対照動物が屠殺され、組織が回収されて、基準のパラメータを定める。動物は、任意の好適な方法（例えば、短期の手順のためのイソフルオランの吸入または長期の手順ためのケタミン／キシラジン注射が挙げられる）によって麻酔される。

【０２１７】

【表４】

表3
感染性疾患の動物モデル

微生物	実験動物の種	実験動物の系統	性別	年齢	感染経路
Francisella philomiraga	マウス	BALB/C	M	6 W	腹腔内
Neisseria meningitidis	マウス	BALB/C	F	6-10 W	腹腔内
	ラット	COBS/CD	M/F	4 D	鼻腔内
Streptococcus pneumoniae	マウス	BALB/C	F	6 W	鼻腔内
	ラット	COBS/CD	M	6-8 W	鼻腔内
	テンジクネズミ	ハートリー	M/F	4-5 W	鼻腔内
Yersinia pseudotuberculosis	マウス	BALB/C	F	6 W	鼻腔内
Influenza virus	マウス	BALB/C	F	6 W	鼻腔内
Sendai virus	マウス	CD-1	F	6 W	鼻腔内
	ラット	スピローグ／ダウリー	M	6-8 W	鼻腔内
Sindbis	マウス	CD-1	M/F	1-2 D	脳内／ＳＣ
Vaccinia	マウス	BALB/C	F	2-3 W	皮内

【０２１８】

Ｅ．ワクチンの評価についてのアッセイ

いくつかの実施形態において、ナノエマルションワクチンの候補物は、種々の好適なモデル系の１つを用いて評価される。例えば、細胞媒介性の免疫応答はインビトロにおいて評価され得る。さらに、病原体の攻撃に対するインビボの免疫応答および免疫を評価するために、動物モデルが使用され得る。任意の好適な動物モデルが利用され得、当該動物モデルとしては、表３に記載されている動物モデルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１９】

ナノエマルションワクチンを試験する前に、ナノエマルションに対する病原体のばくろの、病原体を不活性化させるために十分な量が調べられる。病原体（例えば細菌の胞子）

は、十分に中和されて免疫化を可能にするためのナノエマルションによる不活性化のために、より長い期間を要することが考慮される。不活性化に要する期間は、任意の好適な方法（以下の具体例に記載されている方法が挙げられるが、これらに限定されない）を用いて調べられ得る。

【０２２０】

さらに、エマルションを用いて開発されたワクチンの安定性、特に長期にわたる保存条件が評価されて、ワクチンの長期にわたる有効性を確保する。また、ワクチンの安定性および免疫原性を向上させるために他の安定化材料（例えば樹状重合体）の安定性が評価される。

【０２２１】

所定のナノエマルション／病原体のワクチンが調合されて、病原体の不活性化をいったん生じると、免疫応答を誘導し、免疫を付与するワクチンの能力が最適化される。ワクチンの有効性を試験する方法の非限定的な例が、以下の実施例１～４に記載されている。例えば、ワクチン接種のタイミングおよびワクチンの投与量は、変更され得、最も有効な投与量および投与計画が決定され得る。免疫応答のレベルは、血清における抗体レベルの測定によって定量化される。さらに、インビトロアッセイが使用されて、H^3－チミジンの取り込みを測定することによって増殖活性を観察する。増殖に加えて、Ｔｈ１およびＴｈ２のサイトカイン応答（例えば、ＩＬ－２、ＴＮＦ－γ、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２を含んでいるレベルなどが挙げられるが、これらに限定されない）が測定されて、免疫応答を定量的に評価する。

【０２２２】

最後に、動物モデルが利用されて、ナノエマルションの粘膜用のワクチンの作用を評価する。精製された病原体は、エマルションにおいて混合され（るか、またはエマルションは、感染前の動物に接触させられ）、投与され、免疫応答が測定される。それから、予防のレベルは、特定の病原体を用いた動物の抗原投与、および続く疾患の症状のレベルを調べることによって評価される。免疫のレベルが長期にわたって測定されて、追加免疫の必要性および間隔を決定する。

【０２２３】

ＩＩＩ．治療薬および予防薬

さらに、好ましい実施形態において、本発明の組成物は、例えば対象に投与されたときに、全身性免疫および粘膜免疫の両方を誘導する。いくつかの好ましい実施形態において、対象に対する本発明の組成物の投与は、ＲＳＶに対するばくろ（例えば、粘膜ばくろ）からの防御を生じる。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、粘膜投与（例えばワクチン接種）は、ＲＳＶ感染（例えば、粘膜表面に起こる）からの防御をもたらす。分泌性のＩｇＡの刺激および粘膜表面に侵入する病原体からの保護は、これまで困難であると示されている（例えば、Mestecky et al, Mucosal Immunology. 3ed edn. (Academic Press, San Diego, 2005)を参照すればよい）が、いくつかの実施形態において、本発明は、対象における病原体に基づく粘膜免疫（例えば、防御的なＩｇＡ応答）を刺激する組成物および方法を提供する。

【０２２４】

いくつかの実施形態において、本発明は、粘膜ワクチンとして機能する組成物を提供する。当該組成物は、例えば、ＮＥ、およびＲＳＶに由来する免疫原性のタンパク質抗原を含んでいる。当該タンパク質抗原は、例えば、Ｍ２ペプチド、Ｆタンパク質および／または他のタンパク質／ペプチド抗原もしくは病原性因子である。いくつかの実施形態において、この物質は、ＮＥならびにＭ２、Ｆタンパク質および／または他のタンパク質／ペプチド（例えば、ウイルス由来のタンパク質、生きたウイルスベクター由来のタンパク質、組換えタンパク質、組換え変性タンパク質／抗原、小ペプチド断片のタンパク質／ペプチド）を用いて容易に生成され得、粘膜免疫および全身性免疫の両方を誘導し得る。この組成物を迅速に生成する能力および粘膜（例えば経鼻）への滴下を介してこの組成物を投与する能力によって、例えば町、村、市、州または国家の集団に対する、大規模な投与に使

用され得るワクチンがもたらされる。

【０２２５】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、免疫応答を生じさせる組成物を提供する。当該組成物は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる。当該免疫原は、例えば、精製されているか、単離されているか、または合成のタンパク質、またはこれらの誘導体、バリアントまたは類似物；またはナノエマルションによって不活性化されているＲＳＶの１つ以上の血清型である。対象に投与されたときに、本発明の組成物は、対象の内部における免疫原に対する免疫応答を刺激する。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、免疫応答の発生（例えばナノエマルションおよび免疫原を含んでいる組成物の投与から生じる）によって、（例えば、疾患（例えばＲＳＶ）の徴候、症状または障害からの）対象に対する全体的または部分的な免疫がもたらされる。任意の特定の理論に縛られることなく、本発明の免疫原性組成物に対するばくろ後における、疾患からの防御および／または免疫（例えば、疾患の徴候、症状または傷害を予防するか、または減弱させる（例えば抑制する）対象の免疫系の能力）は、適応的（獲得）免疫応答（例えば、本発明の免疫原を含んでいるＮＥに対するばくろに続く、Ｂ細胞およびＴ細胞によって媒介される免疫応答（例えば、ＲＳＶに対する増強された特異性および反応性を示す免疫応答））に起因している。したがって、いくつかの実施形態において、本発明の組成物および方法は、予防的または治療的に使用されて、ＲＳＶと関連する徴候、症状または障害を予防するか、または減弱させる。

【０２２６】

いくつかの実施形態において、免疫原（例えば組換えＲＳＶタンパク質）を含んでいるＮＥは、単独に投与される。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原（例えば組換えＲＳＶタンパク質）を含んでいる組成物は、他の因子（例えば、薬学的に受容可能な担体、免疫賦活剤および賦形剤など）の１つ以上を含んでいる。いくつかの実施形態において、本発明の免疫応答を刺激する組成物は、体液性免疫応答を誘導するように投与される。いくつかの実施形態において、本発明の免疫応答を刺激する組成物は、体液性反応ではなくむしろ、細胞性（細胞傷害性Ｔリンパ球）免疫応答を誘導するように投与される。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、細胞性免疫応答および体液性免疫応答の両方を誘導する。

【０２２７】

本発明は、ＮＥおよび免疫原（例えば当該ナノエマルションによって不活性化されているＲＳＶ）を含んでいる組成物に使用されるパラミクソウイルス科に属するウイルスの型または株（例えば、パラミクソウイルス亜科のウイルス（例えば、パラミクソウイルス、ルブラウイルスおよび／またはモルビリウイルス）および／またはニューモウイルス亜科のウイルス（例えば呼吸器合胞体ウイルス））によって限定されない。実際に、各パラミクソウイルス科のメンバーの単独、または他のメンバーとの組合せが、ＮＥおよび免疫原（例えば、免疫応答を生じさせるために使用される）を含んでいる本発明の組成物を生成させるために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶのＡ２株（ＡＴＣＣ（Manassas, VA）から入手可能である：ＡＴＣＣアクセションＮｏ．VR-1540）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶのＢ株（B WV/14617/85、ＡＴＣＣアクセションＮｏ．VR-1400）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶの９３２０株（ＡＴＣＣアクセションＮｏ．VR-955）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶの１８５３７株（ＡＴＣＣアクセションＮｏ．VR-1580）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶのＬｏｎｇ株（ＡＴＣＣアクセションＮｏ．VR-26）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルスは、ＲＳＶのＬｉｎｅ株（例えば、Lukacs et al., Immunopathology and Infection, 169, 977-986 (2006)を参照すればよい）である。したがって、利用されるウイルス（例えばＲＳＶ）株は、より強い病原性の能力を示す（例えばＲＳＶによって引き起こされるより重篤な疾患（例えば、気道の増強された過敏性および／または粘液の過剰産生を包含している）をもたらす、）、改変された（例えば、遺伝的に改変された（例え

ば、自然淘汰を介して天然に改変されたか、または遺伝子組換え技術を用いて改変された））株である。いくつかの実施形態において、パラミクソウイルス科のメンバーうちの任意のメンバーが、本発明の免疫応答性組成物に使用され、当該メンバーとしては、パラミクソウイルス、ルブラウイルス、モルビリウイルスおよび呼吸器合胞体ウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明は使用されるウイルスの株によって限定されない。実際に、種々のウイルスの株が、本発明において有用であると考えられ、当該株としては、古典株、弱毒株、非複製性の株、改変株（例えば、遺伝的にか、または機械的に改変された株（例えば、より強いか、またはより弱い病原性にするために））または段階希釈された他の株が挙げられるが、これらに限定されない。ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、ＲＳＶおよび／またはパラミクソウイルス科に属する他の種類のウイルスの１つ以上を含み得る。さらに、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、ＲＳＶの株の１つ以上、およびこれに加えて非ＲＳＶウイルス免疫原の株の１つ以上を含み得る。

【０２２８】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、病原体（例えばＲＳＶ）に由来する１つ以上の抗原を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記免疫原は、例えば免疫原性組成物を生成するためにＮＥに加えられる、精製されたか、組換えのか、合成のか、またはそうでなければ単離されたタンパク質である。同様に、免疫原性のタンパク質は、病原体からのタンパク質の、誘導体、類似物、またはそうでなければ改変された（例えばＰＥＧ付加された）形態であり得る。

【０２２９】

本発明は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物の特定の剤形によって限定されない。実際に、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、ＮＥおよび免疫原に加えて、１つ以上の異なる因子を含み得る。これらの因子または補助因子としては、免疫賦活剤、界面活性剤、添加剤、緩衝材、可溶化剤、キレータ、油、塩、治療薬、薬物、生理活性物質、抗菌剤、および抗微生物剤（例えば、抗生物質および抗ウイルス剤など）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、当該免疫原が免疫応答を誘導する能力を増強する因子および／または補助因子（例えば免疫賦活剤）を含んでいる。いくつかの好ましい実施形態において、１つ以上の因子および／または補助因子の存在によって、免疫応答（例えば防御的な免疫化）の誘導に必要とされる免疫原の量が低減される。いくつかの実施形態において、１つ以上の因子および／または補助因子の存在は、細胞性（例えば、Ｔ細胞媒介性）または体液性（例えば、抗体媒介性）の免疫応答へと上記免疫応答を進めるために使用され得る。本発明は、本発明の治療薬に使用される因子および／または補助因子の種類によって限定されない。

【０２３０】

免疫賦活剤は、Vaccine Design--the Subunit and Adjuvant Approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, New York, 1995に一般的に記載されている。本発明は、（例えば、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物（例えば、薬学的組成物）における使用のために）使用される免疫賦活剤の種類によって限定されない。例えば、いくつかの実施形態において、好適な免疫賦活剤としては、アルミニウム塩（例えば、アルミニウムのヒドロオキシドゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム）が挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫賦活剤は、カルシウム、鉄または亜鉛の塩であり得るか、またはアシル化されたチロシン、アシル化された糖、カチオン性に誘導体化された多糖、アニオン性に誘導体化された多糖、またはポリホスファゼンの不溶性の懸濁物であり得る。

【０２３１】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、Ｔｈ１型の反応を誘導する免疫賦活剤の１つ以上を含んでいることが、好ましい。しかし、他の実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、Ｔｈ２型の反応を誘導する免疫賦活剤の１つ以上を含んでいることが、好ましい。

【０２３２】

一般的に、免疫応答は、免疫系の細胞との抗原の相互作用を通じて、抗原に対してもたらされる。免疫応答は、大きく分けて２つのカテゴリ：体液性の免疫応答および細胞媒介性の免疫応答（例えば、それぞれ防御における抗体および細胞性のエフェクター機構によって特徴付けられている）に分類され得る。反応のこれらのカテゴリは、Ｔｈ１型の反応（細胞媒介性の反応）およびＴｈ２型の免疫応答（体液性反応）と名づけられている。

【０２３３】

免疫応答の刺激は、干渉（例えば免疫原に対するばくろ）に対する免疫系の細胞または構成要素の直接的または間接的な応答を生じ得る。免疫応答は、多くの方法において評価され得る。当該方法としては、免疫系の細胞（例えば、Ｂ細胞、Ｔ細胞、樹状細胞、ＡＰＣ、マクロファージ、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞など）の活性化、増殖または分化；マーカーおよびサイトカインの発現の上方制御または下方制御；ＩｇＡ力価、ＩｇＭ力価またはＩｇＧ力価の刺激；脾腫（増大した脾臓の細胞質が挙げられる）；種々の器官における過形成および混合性の細胞浸潤物が挙げられる。免疫刺激について評価され得る、免疫系の他の反応、細胞および構成要素は、当該分野において公知である。

【０２３４】

機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、本発明の組成物および方法は、例えばマクロファージ、樹状細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞による、サイトカインの発現および分泌を誘導する。特定のサイトカインの発現の調節は局所的または全身性に生じ得る。サイトカインのプロファイルは、免疫応答におけるＴ細胞の調節性機能およびエフェクター機能を決定し得ることが知られている。いくつかの実施形態において、Ｔｈ１型のサイトカインが誘導され得、したがって本発明の免疫刺激性の組成物は、Ｔｈ１型の抗原特異的な免疫応答（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞）を促進し（例えば、これによって、疾患の重症度の深刻化に関与する所望されないＴｈ２型の免疫応答（例えば、Ｔｈ２型のサイトカイン（例えばＩＬ－１３）の産生（例えば粘液形成のＩＬ－１３誘導））を回避し）得る。

【０２３５】

サイトカインはＴ細胞応答を方向付ける役割を果たす。ヘルパ（ＣＤ４＋）Ｔ細胞は、他の免疫系細胞（Ｂ細胞および他のＴ細胞が挙げられる）に採用する可溶性の因子の産生を介して、哺乳類の免疫応答を組織化している。成熟Ｃｄ４＋Ｔヘルパ細胞のほとんどは、２つのサイトカインプロファイル：Ｔｈ１またはＴｈ２の一方を発現している。Ｔｈ１型のＣＤ４＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＦＮ－－γ、ＧＭ－ＣＳＦおよび高レベルのＴＮＦ－αを分泌する。Ｔｈ２細胞は、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＧＭ－ＣＳＦおよび低レベルのＴＮＦ－αを発現する。Ｔｈ１型のサイトカインは、細胞媒介性免疫、ならびにマウスにおけるＩｇＧ２ａおよびヒトにおけるＩｇＧ１への免疫グロブリンのクラススイッチングによって特徴付けられている体液性免疫の両方を促進する。また、Ｔｈ１反応は遅延型の過敏性および自己免疫疾患と関連し得る。Ｔｈ２型のサイトカインは、初期の体液性免疫を誘導し、ＩｇＧおよびＩｇＥへのクラススイッチングを誘導する。Ｔｈ１反応と関連している抗体のアイソタイプは、一般的に中和能およびオプソニン化能を一般的に有しており、Ｔｈ２反応と関連している抗体はアレルギー性反応とより関連している。

【０２３６】

種々の因子は、Ｔｈ１型またはＴｈ２型の反応のいずれかへの免疫応答の進行に影響することが示されている。最もよく性質決定されている調節因子はサイトカインである。ＩＬ－１２およびＩＦＮ－γは、陽性のＴｈ１調節因子であり、陰性のＴｈ２調節因子である。ＩＬ－１２はＩＦＮ－γ産生を促進し、ＩＦＮ－γはＩＬ－１２に正のフィードバックをもたらす。ＩＬ－４およびＩＬ１０は、Ｔｈ２サイトカインプロファイルの成立、およびＴｈ１サイトカインの産生の下方制御に重要であると考えられる。

【０２３７】

したがって、好ましい実施形態において、本発明は対象におけるＴｈ１型の免疫応答を刺激する方法を提供する。当該方法は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物を対象に投

与することを包含している。しかし、他の実施形態において、例えばＴ細胞媒介性の反応の平衡化が所望される場合に、本発明は対象におけるＴｈ２型の免疫応答を刺激する方法を提供する。当該方法は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物を対象に投与することを包含している。さらに好ましい実施形態において、免疫賦活剤（例えば本発明の組成物とともに共投与され得る）が使用されて、Ｔｈ１型またはＴｈ２型の免疫応答のいずれかに免疫応答を進行させ得る。例えば、Ｔｈ２反応を誘導するか、またはＴｈ１反応を弱める免疫賦活剤としては、ミョウバン、サポニンおよびＳＢ－Ａｓ４が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔｈ１反応を誘導する免疫賦活剤としては、ＭＰＬ、ＭＤＰ、ＩＳＣＯＭＳ、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－γおよびＳＢ－ＡＳ２が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３８】

Ｔｈ１型の免疫原の種々の他の種類が、例えば免疫賦活剤として、本発明の組成物および方法において使用され得、これらとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、モノホスホリルリピドＡ（例えば、特に３－デ－Ｏ－アシル化モノホスホリルリピドＡ（３Ｄ－ＭＰＬ））が使用される。３Ｄ－ＭＰＬは、Ribi Immunochem、Montanaによって製造されている周知の免疫賦活剤である。４、５または６位のいずれかにおいてアシル化された側鎖をともなっている３－デ－Ｏ－アシル化モノホスホリルリピドＡの混合物の化学薬品として、しばしば供給されている。いくつかの実施形態において、ジホスホリルリピドＡおよびこれらの３－Ｏ－脱アシル化バリアントが使用される。これらの免疫原のそれぞれは、参照によってその全体が本明細書に援用される独国特許第２１２２２０４号に記載の方法によって精製され得、調製され得る。精製されている他の合成リポ多糖が記載されている（例えば、参照によってそれらの全体が本明細書に援用される、米国特許第６，００５，０９９号および欧州特許第０７２９４７３号；Hilgers et al., 1986, Int.Arch.Allergy.Immunol., 79(4):392-6；Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):141-6；ならびに欧州特許第０５４９０７４号を参照すればよい）。いくつかの実施形態において、３Ｄ－ＭＰＬは、微粒子剤形の形態（例えば直径０．２μｍ未満の小さな粒径を有している）において使用される（参照によってその全体が本明細書に援用される欧州特許第０６８９４５４号に記載されている）。

【０２３９】

いくつかの実施形態において、サポニンが本発明の組成物における免疫原（例えばＴｈ１型の免疫賦活剤）として使用される。サポニンは、周知の免疫賦活剤である（例えば、Lacaille-Dubois and Wagner (1996) Phytomedicine vol 2 pp 363-386参照すればよい）。サポニンの例としては、Quil A（南アメリカの樹木Quillaja Saponaria Molinaの樹皮に由来する）およびこれらの断片が挙げられる（例えば、参照によってそれら全体が本明細書に援用される、米国特許第５，０５７，５４０号；Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55；および欧州特許第０３６２２７９号を参照すればよい）。また、本発明において有用であると考えられるのは、溶血性のサポニンQS7、QS17およびQS21（Quil AのＨＰＬＣ精製された画分）である（例えば、参照によってそれらの全体が本明細書に援用される、Kensil et al. (1991). J. Immunology 146,431-437、米国特許第５，０５７，５４０号、国際公開第９６／３３７３９号、国際公開第９６／１１７１１号および欧州特許第０３６２２７９号を参照すればよい）。また、本発明に有用であると考えられるのは、QS21とポリソルベートまたはシクロデキストリンとの組合せである（例えば、参照によってその全体が本明細書に援用される国際公開第９９／１００８号を参照すればよい）。

【０２４０】

いくつかの実施形態において、非メチル化のＣｐＧジヌクレオチド（ＣｐＧ）を含んでいる免疫原性のオリゴヌクレオチドが本発明において免疫賦活剤として使用される。ＣｐＧは、ＤＮＡに存在しているシトシン－グアノシンジヌクレオチドモチーフの略語である。ＣｐＧは、全身性経路および粘膜経路の両方によって投与されたときの免疫賦活剤として当該分野において公知である（例えば、参照によってそれらの全体が本明細書に援用さ

れる、国際公開第９６／０２５５５号、欧州特許第４６８５２０号、Davis et al., J.Immunol, 1998, 160(2):870-876、McCluskie and Davis, J.Immunol., 1998, 161(9):4463-6、および米国特許出願公開第２００５０２３８６６０号を参照すればよい）。例えば、いくつかの実施形態において、免疫刺激性の配列はプリン－プリン－Ｃ－Ｇ－ピリミジン－ピリミンジンであり、ここでＣＧモチーフはメチル化されていない。

【０２４１】

機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、１つ以上のＣｐＧオリゴヌクレオチドの存在によって、種々の免疫の部分集合（マクロファージおよび（ＩＦＮ－γを産生している）ナチュラルキラー細胞が挙げられる）が活性化される。いくつかの実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、免疫応答を誘導する本発明の組成物のなかに調合されている。いくつかの実施形態において、ＣｐＧの遊離溶液が、抗原（例えばＮＥ溶液内に存在している）とともに共投与される（例えば、参照によって本明細書に援用される国際公開第９６／０２５５５号を参照すればよい）。いくつかの実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、抗原に共有結合されている（例えば、参照によって本明細書に援用される国際公開第９８／１６２４７号を参照すればよい）か、または担体（例えば水酸化アルミニウム）とともに調合されている（例えば、Brazolot-Millan et al., Proc.Natl.AcadSci., USA, 1998, 95(26), 15553-8を参照すればよい）。

【０２４２】

いくつかの実施形態において、以下の免疫賦活剤がＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明組成物とともに使用される。当該免疫賦活剤は、例えば、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、サイトカイン（例えば、インターロイキン（例えば、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４など）、マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子など）、細菌のＡＤＰ－リボシル化毒素（例えば、コレラ毒素（ＣＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、またはE. coliの熱不安定性毒素（ＬＴ）、特にＬＴ－Ｋ６３（６３位にある野生型アミノ酸がリジンに置換されている）、ＬＴ－Ｒ７２（７２位にある野生型アミノ酸がアルギニンに置換されている）、ＬＴ－Ｓ１０９（１０９位にある野生型アミノ酸がセリンに置換されている）、ＰＴ－Ｋ９／Ｇ１２９（９位にある野生型アミノ酸がリジンに置換されており、１２９位にある野生型アミノ酸がグリシンに置換されている）（例えば、参照によってそれぞれ本明細書に援用される国際公開第９３／１３２０２号および国際公開第９２／１９２６５号を参照すればよい））の無毒化変異体、および例えば本発明の組成物の有効性を高める、他の免疫原性物質である。

【０２４３】

本発明における用途が見出されている免疫賦活剤のさらなる例としては、ポリ（ジ（カルボキシラートフェノキシ）ホスファゼン（ＰＣＰＰ重合体；Virus Research Institute、USA）；リポポリ多糖の誘導体（例えば、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ；Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.）、ムラミルジペプチド（ＭＤＰ；Ribi）およびスレオニル－ムラミルジペプチド（ｔ－ＭＤＰ；Ribi））；ＯＭ－１７４（リピドＡと関連するグルコサミン二糖；OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland）；およびリーシュマニアの伸長因子（精製されたリーシュマニアタンパク質；Corixa Corporation, Seattle, Wash.）が挙げられる。

【０２４４】

ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物と組み合わせられるか、または共投与される前に、免疫賦活剤は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物に加えられ得るか、または免疫賦活剤は、担体（例えばアルミニウム塩（例えば水酸化アルミニウム））とともに調合され得る。

【０２４５】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、単一の免疫賦活剤を含んでいる。他の実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、２つ以上の免疫賦活剤を含んでいる（例えば、参照によってそれらの全体が本明細書に援用

される、国際公開第９４／００１５３号、国際公開第９５／１７２１０号、国際公開第９６／３３７３９号、国際公開第９８／５６４１４号、国際公開第９９／１２５６５号、国際公開第９９／１１２４１号および国際公開第９４／００１５３号を参照すればよい）。

【０２４６】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、１つ以上の粘膜付着剤を含んでいる（例えば、参照によってその全体が本明細書に援用される、米国特許出願公開第２００５０２８１８４３号を参照すればよい）。本発明は使用される粘膜付着剤の種類によって限定されない。実際に、種々の粘膜付着剤が本発明において有用であると考えられ、当該粘膜付着材としては、ポリ（アクリル酸）の架橋誘導体（例えば、カルボポルおよびポリカルボフィル）、ポリビニルアルコールの架橋誘導体、ポリビニルピロリドンの架橋誘導体、多糖の架橋誘導体（例えばアルギネートおよびキトサン）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースの架橋誘導体、レクチンの架橋誘導体、線毛タンパク質の架橋誘導体、カルボキシメチルセルロースの架橋誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されない。しかし、粘膜付着剤が使用されない場合の、免疫原に対するばくろの期間および量と比べて、粘膜付着剤が使用される場合の、対象が受ける免疫原に対するばくろの延長された期間および増加した量に起因して、いくつかの実施形態において、例えばＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物における、粘膜付着剤の使用は、対象（例えば本発明の組成物の投与を受けた）における免疫応答の誘導を増強する。

【０２４７】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、滅菌された水性の調製物を含み得る。受容可能なビヒクルおよび溶媒としては、水、リンガー液、リン酸緩衝生理食塩水、および等張性の塩化ナトリウム溶液が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、滅菌された不揮発性油が、従来どおり溶媒または懸濁媒体として使用される。この目的のために、無刺激性の任意の不揮発性の鉱物油または非鉱物油が使用され得、これらとしては１価の合成グリセリドが挙げられる。さらに、脂肪（例えばオレイン酸）は注射剤の調製における用途について見出されている。粘膜投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与または他の経路を介した投与にとって好適な担体調合物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Paに見出され得る。

【０２４８】

ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、治療的（例えば、免疫応答を促進するために）または予防的（例えば、免疫化の（例えば、疾患の徴候または症状を予防する）ために）に使用され得る。ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、異なる送達経路および送達方法を介して対象に投与され得る。

【０２４９】

例えば、本発明の組成物は、複数の方法によって（例えば粘膜（例えば、鼻腔粘膜、膣粘膜など）から）対象に投与され得る。当該複数の方法としては、溶液に懸濁され、表面に塗布されるか；溶液に懸濁され、スプレー噴霧器を用いて表面に噴霧されるか；粘膜付着剤と混合され、表面（例えば粘膜表面）上に塗布（例えば噴霧または塗り広げ）されるか；鼻腔噴霧器もしく膣噴霧器に収納するか、もしくは浸透させて塗布されるか；徐放手段によって加えられるか；リポソームとして加えられるか；；または重合体上に適用される、が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５０】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、例えば標準的な技術を用いて、粘膜に投与される。当該標準的な技術は、例えば、粘膜送達技術（鼻腔内、肺、膣および直腸の技術が挙げられる）（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th edition, 1995を参照すればよい）、および鼻腔内投与の技術（例えば、欧州出願公開第５１７，５６５号and Illum et al., J. Controlled Rel., 1994, 29:133-141を参照すればよい）であり、ここで挙げた各文献は、参照によってその全体が本明細書に援用される。代替的に、本発明の組成物は、標準的な

手法を用いて皮膚または経皮的に投与され得る（例えば、Remington: The Science arid Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th edition, 1995を参照すればよい）。本発明は投与の経路によって限定されない。

【０２５１】

機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されない。しかし、いくつかの実施形態において、抗原の粘膜投与は、多くの病原体の侵入経路である粘膜表面における防御免疫応答（例えば粘膜免疫）を誘導するより高い有効性を有していることが示されているので、粘膜へのワクチン接種は好ましい投与経路である。さらに粘膜へのワクチン接種（例えば鼻腔内へのワクチン接種）は、鼻腔内だけでなく、離れた粘膜部位（例えば性器粘膜）における粘膜免疫を誘導し得る（例えば、Mestecky, Journal of Clinical Immunology, 7:265-276, 1987を参照すればよい）。より有利なことに、さらなる好ましい実施形態において、粘膜免疫応答に加えて、粘膜へのワクチン接種は、また、全身性免疫を誘導する。いくつかの実施形態において、腸管を介した投与（例えばワクチンの粘膜投与）は、全身性免疫（例えば、非経口的なワクチン接種または粘膜へのワクチン接種（例えば、複数回の追加免疫が強い全身性免疫を維持するために利用される場合に）によって誘導される）を高める好都合かつ有効な方法を提供する。

【０２５２】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、粘膜経路（例えば、経口／食餌性または鼻腔の経路）を介した本発明の組成物の投与によって、疾患の疑いがあるか、または疾患に罹っている対象を保護するか、または処置するために使用され得る。代替的な粘膜経路としては、膣内経路および直腸内経路が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、鼻腔を介した投与経路が使用され、本明細書において“鼻腔内経路”または“鼻腔内へのワクチン接種”と呼ばれる。鼻腔内へのワクチン接種の方法は、当該分野において公知であり、当該方法としては、免疫化されるべき対象の鼻咽頭への、液滴または霧状の形態のワクチンの投与が挙げられる。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる、霧状またはエアロゾルの組成物が提供される。また、腸溶性の組成物（例えば、経口投与のための胃抵抗性カプセル剤、直腸投与または膣投与のための座剤）は、本発明の一部を形成している。また、本発明の組成物は、経口経路を介して投与され得る。このような場合、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、薬学的に受容可能な賦形剤を含み得るか、および／またはアルカリ性の緩衝剤もしくは腸溶性カプセル剤を包含し得る。経鼻送達のための組成物としては、デキストランもしくはシクロデキストラン、免疫賦活剤としてのサポニンを有している組成物が挙げられ得る。

【０２５３】

また、本発明の組成物は、膣経路を介して投与され得る。このような場合、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、薬学的に受容可能な賦形剤、および／または膣のクリーム剤および座剤の公知の、乳化剤、重合体（例えば、ＣＡＲＢＯＰＯＬ）、および安定化剤を含み得る、いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、直腸経路を介して投与される。このような場合、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、賦形剤および／または直腸の座剤を形成するための当該分野において公知の蜜蝋および重合体を含み得る。

【０２５４】

いくつかの実施形態において、同じ投与経路（例えば粘膜投与）は、初回免疫および追加免疫のワクチン接種の両方のために選択される。いくつかの実施形態において、複数の投与経路が利用されて（例えば、同時、または代替的に逐次的に）、例えばＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物を用いて、免疫応答を刺激する。

【０２５５】

例えば、いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、初回または追加のワクチン接種のいずれかにおいて対象の粘膜表面に対して投与される。代替的に、いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、初回または追加のワクチン接種のいずれかにおいて全身性に投与される。いくつかの実施形態にお

いて、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、粘膜投与を介して初回のワクチン接種において対象に投与され、全身性投与を介して追加のワクチン接種において対象に投与される。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、全身性投与を介して初回のワクチン接種において対象に投与され、粘膜投与を介して追加のワクチン接種において対象に投与される。全身性の投与経路の例としては、非経口、筋肉内、経皮、皮下、腹腔内または静脈内の投与が挙げられるが、これらに限定されない。ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、予防および治療の目的の両方のために使用され得る。

【０２５６】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、肺への送達によって投与される。例えば、本発明の組成物は、吸入を介して対象（例えばヒト）の肺に送達される（例えば、これによって肺上皮の裏打ちを越えて血流に浸透する）（例えば、参照によってそれらの全体が本明細書に援用される、Adjei, et al. Pharmaceutical Research 1990; 7:565-569；Adjei, et al. Int. J. Pharmaceutics 1990；63:135-144; Braquet, et al. J. Cardiovascular Pharmacology 1989 143-146；Hubbard, et al. (1989) Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212; Smith, et al. J. Clin. Invest. 1989;84:1145-1146；Oswein, et al. "Aerosolization of Proteins", 1990; Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado; Debs, et al. J. Immunol. 1988; 140:3482-3488；および米国特許第５，２８４，６５６号（Platz, et al）を参照すればよい）。全身性作用のための薬物の肺送達にとっての方法および組成物は、参照によって本明細書に援用される米国特許第５，４５１，５６９号（Wong, et al）に記載されている（また、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第６，６５１，６５５号（Licalsi et al）を参照すればよい）。

【０２５７】

本発明の実施のためにさらに考慮されているのは、医薬品の肺送達および／または粘膜送達のために設計されている広範な機械装置（噴霧器、計量式吸入器および粉末吸入器（いずれも当業者によく知られている）が挙げられるが、これらに限定されない）である。本発明の実施にとって好適な市販の装置のいくつかの特定の例は、Ultravent噴霧器（Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.）；Acorn II噴霧器（Marquest Medical Products, Englewood, Colo.）；Ventolin計量式吸入器（Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.）およびSpinhaler粉末吸入器（Fisons Corp., Bedford, Mass.）である。そのような装置のすべては、治療薬の分散のために好適な剤形の使用を必要とする。点家低的に、剤形のそれぞれは、採用される装置の種類に特有であり、通常の希釈剤、補助剤、界面活性剤、担体および／または治療に有効な他の因子の使用を含み得る。また、リポソーム、マイクロカプセルもしくは微粒子、封入複合体、または他の種の担体の使用が考慮されている。

【０２５８】

したがって、いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、粘膜、筋肉内、腹腔内、皮内、経皮、肺、静脈内、皮下または本明細書に記載されている他の投与経路によるＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物の投与によって、疾患に罹っているか、または疾患の疑いがある対象を保護するか、および／または処置するために使用され得る。ワクチン調製物の全身性投与の方法としては、固体のワクチンの衝撃送達（ballistic delivery）のために設計されているシリンジおよび針、または装置（例えば、参照によって本明細書に援用される国際公開第９９／２７９６１号を参照すればよい）、針なしの液体のジェット噴射装置（例えば、参照によってそれぞれ本明細書に援用される米国特許第４，５９６，５５６号および米国特許第５，９９３，４１２号を参照すればよい）、または経皮パッチ（例えば、参照によってそれぞれ本明細書に援用される国際公開第９８／２８０３７号および国際公開第９７／４８４４０号を参照すればよい）が挙げられ得る。また、本発明は、皮膚に適用（例えば、経真皮送達（transdermal）または経皮膚送達（transcutaneous））される抗原の免疫原性を増強させるために使用され得る（例えば、参照によって本明細書に援用される国際公開第９７／２０７３４号および国

際公開第９８／２８０３７号を参照すればよい）。。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、本発明のワクチン組成物を用いてあらかじめ充填されている全身性投与のための送達装置を提供する。

【０２５９】

本発明は、例えば免疫応答を刺激するために（例えば、防御免疫（例えば粘膜免疫および／または全身性免疫）を生じさせるために）、本発明の組成物が投与される対象によって限定されない。実際に、広範な対象が本発明の組成物の投与から利益を被るべく意図されている。好ましい実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、ヒトの対象は、微生物（例えばＲＳＶ）にさらされているか、またはさらされ易い任意の年齢のヒト（例えば、成人、小児、乳児など）である。いくつかの実施形態において、ヒトの対象は、病原性の微生物に対する直接的なばくろをより受け易い対象、または病原体に対するばくろの後に疾患の徴候もしくは症状をより示し易い対象（例えば免疫抑制されている対象）である。いくつかの実施形態において、公衆が、例えば疾患の発症または蔓延を予防するために、本発明の組成物の投与を受ける（本発明の組成物を用いてワクチン接種される）。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の方法および組成物は、保健を目的として国民の集団（例えば、地域、市、州および／または国家の集団）にワクチン接種するために（例えば、疾患を予防するか、または処置するために）利用される。いくつかの実施形態において、対象は、非ヒトの哺乳類（例えば、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギもしくは他の家畜；またはマウス、ラット、ウサギもしくは他の動物）である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物および方法は、例えば研究動物を用いた、研究用途に利用される。

【０２６０】

本発明の組成物は、任意の経路（例えば、粘膜、経口、局所、非経口または本明細書に記載の他の経路）による投与のために調合され得る。上記組成物は、任意の異なる形態（錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、トローチ剤、発泡剤、クリーム剤または液体調製物が挙げられるが、これらに限定されない）の１つ以上であり得る。

【０２６１】

本発明の局所用の組成物は、例えば軟膏剤、クリーム剤もしくはローション剤、発泡剤およびエアロゾルとして与えられ得、適切な従来の添加剤（例えば、保存剤、溶解剤（例えば浸透を補助するための）、および軟膏剤およびクリーム剤における軟化剤）を含み得る。

【０２６２】

また、局所用の組成物は、活性成分の皮膚の透過を促進する因子を含み得る。例示的な因子としては、Ｎ－（ヒドロキシエチル）ピロリドンおよび細胞外皮傷害性の化合物の二元配合物、スルホキシドまたはホスフィン酸化物との組合せにおける糖エステル、ならびにスクロースモノオレイン酸塩、デシルメチルスルホキシド、ならびにアルコールが挙げられる。

【０２６３】

皮膚への浸透を促進する例示的な他の物質としては、界面活性剤もしくは湿潤剤（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸塩（Polysorbate 80）；ソルビタンモノオレイン酸塩（Span 80）；ｐ－イソオクチルポリオキシエチレン－フェノール重合体（Triton WR-1330）；ポリオキシエチレンソルビタントリオレイン酸塩（Tween 85）；ジオクチルナトリウムスルホスクシネート；ナトリウムサルコシネート（Sarcosyl NL-97）；薬学的に受容可能な他の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられる。

【０２６４】

本発明のある実施形態において、組成物は、アルコール、亜鉛含有化合物、軟化剤、湿潤剤、増粘剤および／またはゲル化剤、中和剤、ならびに界面活性剤のうちの１つ以上をさらに含み得る。組成物に使用される水は、中性のｐＨを有している脱イオン化水であることが好ましい。局所用の組成物におけるさらなる添加剤としては、シリコンフルイド（silicon fluids）、色素、芳香剤、ｐＨ調節剤、およびビタミンが挙げられるが、これら

に限定されない。

【０２６５】

また、局所用の組成物は、適合性の従来の担体（例えば、クリーム剤もしくは軟膏剤の基剤、およびローション剤用のエタノールもしくはオレイルアルコール）を含み得る。そのような担体は、組成物のうち約１％のから最大で約９８％のとして存在し得る。軟膏剤の基剤は、ペトロラタム、鉱物油、セレシン、ラノリンアルコール、パンテノール、グリシン、ビサボロールおよびカカオ脂などのうちの１つ以上を含み得る。

【０２６６】

いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、調合されて発泡剤として使用され得る。薬学的な発泡剤としては、組成物（これらに限定されないが、例えば乳化剤、マイクロエマルション、クリーム剤、ゼリー剤およびリポソーム）が挙げられる。性質の上では基本的に類似である一方で、これらの組成物は、最終生成物の成分および濃度において異なる。

【０２６７】

本発明の組成物は、薬学的組成物においてこれまでに見出されている補助的な他の成分をさらに含み得る。したがって、例えば、上記組成物は、薬学的に活性な適合性のさらなる物質（例えば、鎮痒剤、収斂剤、局所麻酔剤、または抗炎症剤など）、または本発明の組成物の種々の形態の物理的な調合において有用なさらなる物質（例えば、色素、香料添加剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定化剤）を含み得る。しかし、加えられる場合に、そのような物質は、本発明の組成物の構成要素の生物学的な活性に対して不適当に干渉しないことが好ましい。組成物は、滅菌され得、当該組成物のＮＥおよび免疫原と有害に相互作用しない助剤（例えば、潤滑剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩、緩衝剤、着色剤、香味剤および／または芳香物質など）と必要に応じて混合され得る。いくつかの実施形態において、本発明の免疫刺激組成物は、薬学的に受容可能な塩の形態において投与される。使用時に当該塩は薬学的に受容可能であるべきだが、薬学的に受容可能ではない塩は薬学的に受容可能なそれらの塩を調製するためにこれまで使用されている。当該塩としては、以下の酸から調製され得る塩が挙げられるが、これらに限定されない。当該酸は、塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、ｐ－トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、蟻酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン－２－スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸である。また、当該塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩（例えば、カルボン酸の群のナトリウム、カリウムまたはカルシウムの塩）として調製され得る。

【０２６８】

好適な緩衝剤としては、酢酸および塩（１～２％のｗ／ｖ）；クエン酸および塩（１～３％のｗ／ｖ）；ホウ酸および塩（０．５～２．５％のｗ／ｖ）；ならびにリン酸および塩（０．８～２％のｗ／ｖ）が挙げられるが、これらに限定されない。好適な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム（０．００３～０．０３％のｗ／ｖ）；クロロブタノール（０．３～０．９％のｗ／ｖ）；パラベン（０．０１～０．２５％のｗ／ｖ）；およびチメロサール（０．００４～０．０２ｗ／ｖ）が挙げられ得る。

【０２６９】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、１つ以上の抗生剤をともなって投与される。例えば、１つ以上の抗生剤は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物の投与と同時にか、当該投与の前にか、および／または当該投与の後に投与され得る。本発明は、ともに投与される抗生剤の種類によって限定されない。実際に、種々の抗生剤がともに投与され得、当該抗生剤としては、β－ラクタム抗生剤、ペニシリン（例えば、天然のペニシリン、アミノペニシリン、ペニシリナーゼ耐性ペニシリン、カルボキシペニシリン、ウレイドペニシリン）、セファロスポリン（第１世代、第２世代および第３世代のセファロスポリン）、および他のβ－ラクタム（例えば、イミペネム、モノバクタム）、β－ラクタマーゼ阻害剤、バンコマイシン、アミノグリコシドおよびスペクチノマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、リンコマイ

シン、クリンダマイシン、リファンピン、メトロニダゾール、ポリミキシン、ドキシサイクリン、キノロン（例えば、シプロフロキサシン）、スルホンアミド、トリメトプリムならびにキノリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７０】

細菌、真菌およびウイルスの感染の処置における用途において現在、利用可能な非常に多くの抗菌剤がある。そのような薬物の一般的な分類、およびそれらの作用機序について包括的な学術論文について、当業者は、参照によってその全体が本明細書に援用される、Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Eds. Hardman et al., 9th Edition, Pub. McGraw Hill, chapters 43 through 50, 1996を参照すればよい。一般的に、これらの因子としては、細胞壁の合成を阻害する因子（例えば、ペニシリン、セファロスポリン、シクロセリン、バンコマイシン、バシトラシン）；イミダゾール抗真菌剤（例えば、ミコナゾール、ケトコナゾールおよびクロトリマゾール）；微生物の細胞膜の崩壊に直接的に作用する因子（例えば、界面活性剤（例えば、ポリミキシンおよびポリスチメテート）、抗真菌剤ニスタチンおよびアンフォテリシンＢ）；タンパク質合成を阻害するためにリボソームサブユニットに影響を与える因子（例えば、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシンおよびクリンダマイシン）；タンパク質合成を変化させ、細胞死に導く因子（例えば、アミノグリコシド）；核酸の代謝に影響を与える因子（例えば、リファマイシンおよびキノロン）；代謝拮抗物質（例えば、トリメトプリムおよびスルホンアミド）；ＤＮＡ合成にとって必須のウイルス酵素の阻害に作用する核酸類似物（例えば、ジドブジン、ガンシクロビル、ビダラビンおよびアシクロビル）が挙げられる。抗菌剤の種々の組合せが採用され得る。

【０２７１】

また、本発明は、１つ以上の付加的な活性剤および／または免疫刺激剤を有しており、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物（例えば、ＮＥおよび異なる免疫原、抗生剤、抗酸化剤などを含んでいる組成物）の共投与に関する方法を包含している。実際に、本発明のさらなる局面は、本発明の組成物を共投与することによって従来技術の免疫刺激方法（例えば、免疫化方法）および／または薬学的組成物を改良する方法を提供することである。共投与の手法において、上記因子は、同時にか、または逐次に投与され得る。一実施形態において、本明細書に記載の組成物は、（複数の）他の活性剤の前に投与される。薬学的組成物および投与の方法は、本明細書に記載されているもののうちのいずれかであり得る。実際に、共投与される２つ以上の因子のそれぞれは、異なる様式（例えば投与経路）または異なる組成物を用いて投与され得る。共投与されるべきさらなる因子は、当該分野において公知の因子のうちのいずれかであり得、当該因子としては、現在、臨床において使用されている因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７２】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物は、２つ以上の経路を介して対象に投与される。例えば、病原性の微生物に対する防御免疫応答（例えば免疫）を有していることによって利益を被る対象は、粘膜投与（例えば、鼻腔投与または本明細書に記載の他の粘膜経路）を受けること、およびさらに１つ以上の他の経路の投与（例えば、非経口投与または肺投与（例えば、噴霧器、吸入器または本明細書に記載の他の方法を介する））を受けることによって、利益を被り得る。いくつかの実施形態において、粘膜経路を介した投与は、免疫原または当該免疫原が由来する生物に対する粘膜免疫および全身性免疫の両方を誘導するために十分である。他の実施形態において、複数の経路を介した投与は、粘膜免疫および全身性免疫の両方をもたらすために役立つ。したがって、機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、投与（例えば、免疫化（例えば、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物の、粘膜および気道もしくは非経口の投与））の複数の経路を介して本発明の組成物を投与をされた対象は、単一の経路のみを介した組成物の投与を受けた対象より、免疫原に対する強い免疫応答を示す。

【０２７３】

他の送達系としては、時限放出、遅延放出または徐放性の送達系が挙げられ得る。そのような系は、組成物の繰返しの投与を回避し得、対象および医師にとっての利便性を高める。多くの種類の放出送達系が、利用可能であり、当業者にとって公知である。それらとしては、重合体に基づく系（例えばポリ（ラクチド－グリコリド）、コポリオキシレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ無水物）が挙げられる。薬物を含有している上述の重合体のマイクロカプセルは、例えば参照によって本明細書に援用される米国特許第５，０７５，１０９号に記載されている。また、送達系としては、非重合体の系（例えば脂質（ステロール（例えば、コレステロール、コレステロールエステル）および脂肪酸もしくは中性脂肪（例えば、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリド）が挙げられる）；ヒドロゲルの放出系；サイラスティック（sylastic）系；ペプチドに基づく系；蜜蝋被覆；従来の結合剤および賦形剤を用いた圧縮錠；および部分的に融合した埋込片など）が挙げられる。特定の例としては、以下の（ａ）および（ｂ）が挙げられるが、これらに限定されない。（ａ）本発明の因子がマトリクス（例えば、参照によってそれぞれ本明細書に援用される米国特許第４，４５２，７７５号、米国特許第４，６７５，１８９号および米国特許第５，７３６，１５２号に記載のマトリクス）内にある形態において含有されている侵食性の系；ならびに（ｂ）活性成分が重合体（例えば、参照によってそれぞれ本明細書に援用される米国特許第３，８５４，４８０号、米国特許第５，１３３，９７４号および米国特許第号５，４０７，６８６に記載の重合体）から制御された割合において透過する拡散性の系。さらに、ポンプに基づく機械設備の送達系が使用され得、そのうちのいくつかは、埋込みに適合されている。

【０２７４】

好ましい実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、対象に投与されたときに対象における免疫応答を誘導するために適切な量の当該免疫原を含んでいる。好ましい実施形態において、免疫応答は、上記免疫原、または当該免疫原に由来する微生物（例えば細菌またはウイルス）に対する後のばくろからの対象の防御（例えば免疫防御）をもたらすために十分な程度である。本発明は使用される免疫原の量によって限定されない。いくつかの好ましい実施形態において、ＮＥおよび免疫原（例えば、免疫化の投与量としての使用のために）を含んでいる組成物における免疫原（例えば、ＮＥによって中和されたウイルスもしくは細菌、または組換えタンパク質）の量は、顕著に有害な副作用を示すことなく防御応答を誘導する量として選択される。上記量は、採用される特定の免疫原もしくはこれらの組合せに依存して変わり、要因の数（対象の種、年齢および一般的な状態、ならびに投与の様式が挙げられるが、これらに限定されない）に依存して対象ごとに変わる。対象における免疫応答（例えば防御免疫応答（例えば防御免疫））を惹起するために投与されるべき免疫原の適切な量は、当業者にとってよく知られている。

【０２７５】

いくつかの実施形態において、例えばＮＥおよび免疫原（例えば、免疫応答（例えば防御免疫応答（例えば防御免疫））を誘導するために対象に投与される）を含んでいる組成物の、それぞれの投与量には、０．０５～５０００μｇのそれぞれの免疫原が含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、１～５００μｇの免疫原（例えば、組換えタンパク質および／または精製タンパク質）が含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、５０～２００μｇの免疫原が含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、２５～７５μｇの免疫原が含まれている。単回投与量における免疫の有効な量は、免疫原の当該量が対象に投与されたときに免疫応答を生じる限り、定量化される必要はない。特定の投与（例えば、免疫応答（例えば防御免疫応答（例えば防御免疫））を誘導するための）にとって最適な量は、対象における抗体の力価および他の反応の観察に関する標準的な試験を用いて当業者によって確認され得る。

【０２７６】

いくつかの実施形態において、例えばＮＥおよび免疫原（例えば、免疫応答（例えば防

御免疫応答（例えば防御免疫））を誘導するために対象に投与される）を含んでいる組成物の、それぞれの投与量には、０．００１～１５重量％の以上（例えば、０．００１～１０％、０．５～５％、１～３％、２％、６％、１０％または１５％以上）の免疫原（例えば、中和された細菌またはウイルス、または組換えタンパク質および／または精製タンパク質）が含まれている。いくつかの実施形態において、開始または初回の投与量は、続く追加免疫の投与量よい多くの免疫原を含んでいる。

【０２７７】

いくつかの実施形態において、本発明のＮＥが生きた微生物（例えばウイルス（例えばＲＳＶ））を不活性化させるために使用されるとき、例えば免疫応答を誘導するために対象に投与される、それぞれの投与量には、当該投与量につき１０～10^9ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき１０～10^9ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^5～10^8ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^5～10^5ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^2～10^4ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき１０ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^2ｐｆｕのウイルスが含まれており、いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^4ｐｆｕのウイルスが含まれている。いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^9ｐｆｕのウイルスが含まれている。いくつかの実施形態において、それぞれの投与量には、当該投与量につき10^3ｐｆｕのウイルスが含まれている。

【０２７８】

本発明は、生きた微生物（例えばウイルス（例えば１つ以上のＲＳＶ））を不活性化させるために使用されるＮＥの量によって限定されない。病原体微生物を不活性化させるために、いくつかの実施形態において０．１％以上の５％のＮＥ溶液が使用され、いくつかの実施形態において５％以上の２０％のＮＥ溶液が使用され、いくつかの実施形態において２０％のＮＥ溶液が使用され、いくつかの実施形態において２０％のを超えるＮＥ溶液が使用される。好ましい実施形態において、１５％のＮＥ溶液が使用される。

【０２７９】

同様に、本発明は、不活性な状態にさせるために生きた微生物が本発明のＮＥにおいてインキュベートされる期間によって限定されない。いくつかの実施形態において、微生物は１～３時間にわたってＮＥにおいてインキュベートされる。いくつかの実施形態において、微生物は３～６時間にわたってＮＥにおいてインキュベートされる。いくつかの実施形態において、微生物は６時間を超えてＮＥにおいてインキュベートされる。好ましい実施形態において、微生物は３時間にわたってＮＥ（例えば、１０％のＮＥ溶液）においてインキュベートされる。いくつかの実施形態において、インキュベーションは３７℃において実施される。いくつかの実施形態において、インキュベーションは３７℃を超えるか、または３７℃未満の温度において実施される。また、本発明は不活性化に使用される微生物の量によって限定されない。微生物の量は以下に挙げる要因の数に依存し得る。当該要因としては、所望される免疫原性組成物（例えば、ＮＥおよび免疫原）の総量、所望される溶液の濃度（例えば、投与のための希釈前の）、微生物およびＮＥが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの好ましい実施形態において、不活性化手順に使用される微生物の量は、対象に対する単回投与量（例えば濃縮ストックから希釈された）において投与されるべき免疫原の所望される量をもたらす量（例えば本明細書に記載されているような）である。

【０２８０】

いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物は、対象に対する投与前に希釈され得る濃縮された用量において調合されている。例えば、濃縮さ

れた組成物の希釈物は、対象が本明細書に与えられている特定の投与量のうち任意の１つ以上を受け取るように、対象に投与され得る。いくつかの実施形態において、濃縮された組成物の希釈物は、濃縮された組成物に存在しているＮＥおよび免疫原の０．５～５０％を含んでいる組成物の投与を、例えば単回投与において、対象が受けるように作製され得る。いくつかの好ましい実施形態において、対象は、濃縮された組成物に存在しているＮＥおよび免疫原の１％のを含んでいる組成物の投与を、単回投与において受ける。濃縮された組成物は、非常に多数の対象が本発明の組成物の投与を受け得る場合（例えば、ワクチン接種の施設、病院、学校など）に有用であると考えられる。いくつかの実施形態において、ＮＥおよび免疫原を含んでいる本発明の組成物（例えば、濃縮された組成物）は、１週間を超えて、いくつかの実施形態において２週間を超えて、いくつかの実施形態において３週間を超えて、いくつかの実施形態において５週間を超えて、いくつかの実施形態において６週間を超えて、室温において安定である。

【０２８１】

一般的に、本発明のエマルション組成物は、１ｍｌの液体の組成物につき、少なくとも１％～１００％の、好ましくは０．０１％～９０％のエマルションを含んでいる。組成物は、１ｍｌの液体の組成物につき、約０．００１％の、約０．００２５％の、約０．００５％の、約０．００７５％の、約０．０１％の、約０．０２５％の、約０．０５％の、約０．０７５％の、約０．１％の、約０．２５％の、約０．５％の、約１．０％の、約２．５％の、約５％の、約７．５％の、約１０％の、約１２．５％の、約１５％の、約２０％の、約２５％の、約３０％の、約３５％の、約４０％の、約５０％の、約５５％の、約６０％の、約６５％の、約７０％の、約７５％の、約８０％の、約８５％の、約９０％の、約９５％のまたは約１００％のエマルションを含んでいることが想定されている。上述した任意の２つの数字の間にある範囲は、本発明の境界および範囲内に特に包含されるべく意図されていることを理解すべきである。投与量における幾分の変動は、特定の病原体および免疫化される特定の対象の状態にしたがって必然的に生じる。

【０２８２】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物の初回投与（例えば、初回免疫）に続いて、対象は、１回目、２回目、３回目、４回目、５回目、６回目、７回目、８回目、９回目、１０回目、および／または１１回目以降の投与に続いて、（例えば約２週間後、約３週間後、約４週間後、約５週間後、約６週間後、約７週間後、約８週間後、約１０週間後、約３ヶ月後、約４ヶ月後、約６ヶ月後、約９ヶ月後、約１年後、約２年後、約３年後、約５年後、約１０年後に）１回以上の追加投与を受け得る。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されない。しかし、いくつかの実施形態において、追加の投与における免疫原の再導入は、対象における強い全身性免疫を可能にする。追加免疫は、初回の免疫応答のために与えられた同じ組成物を用い得るか、または同じ免疫原を含んでいる異なる組成物を用い得る。また、投与計画は、対象による必要性によって少なくとも部分的に決定され、医師の判断に依存している。

【０２８３】

投与単位は、種々の要因（対象の体重、年齢および健康状態が挙げられるが、これらに限定されない）に基づいて比例的に増加し得るか、または減少し得る。さらに、投与単位は、続く投与（例えば、追加投与）に関して増加し得るか、または減少し得る。

【０２８４】

免疫原を含んでいる本発明の組成物は、感染および／または疾患を引き起こす因子の性質が公知である（例えば、防御免疫が惹起される）場合の用途、および感染および／または疾患を引き起こす因子の性質（例えば、突発的な疾患における性質（例えば流行の割合（例えば、インフルエンザまたは他の疾患の発生））が未知である場合の用途が見出されている。例えば、本発明は、いまだ同定されていない新たな感染性の因子および／または新たな疾患を引き起こす因子と関連する感染症の、処置または予防における、本発明の組成物の使用を意図している。当該処置または予防は、例えばＲＳＶ様の因子を用いた免疫化を介している。当該因子は、例えば疾患に罹っているヒトから単離されているか、お

よび／または培養されているが、当該因子の遺伝的性質、生化学的性質または他の性質が同定されていない。

【０２８５】

本発明の組成物および方法は、種々の場面（研究用途が挙げられる）における使用について見出されるであろうことが意図されている。また例えば、本発明の組成物および方法は、免疫系（例えば適合性免疫応答（例えば防御免疫応答（例えば粘膜免疫または全身性免疫））の研究における使用について見出されている。本発明によって提供される組成物および方法の使用は、ヒトおよび非ヒトの対象ならびにこれらの対象から得られたサンプルを包含しており、これらの対象を用いた研究用途を包含している。また、本発明の組成物および方法は、ナノエマルション、免疫原および他の構成成分の研究および最適化、ならびに新たな構成成分のスクリーニングにとって有用である。したがって、本発明は、任意の特定の対象および／または用途に限定されないことが意図されている。

【０２８６】

組成物は、粘膜送達または他の送達経路の研究のために開発された多くの動物モデルのインビボにおいて試験され得る。直ちに明らかになる通り、本発明の組成物は、ウイルス、細菌、寄生生物および真菌によって引き起こされる広範な疾患および感染の予防および／または処置、ならびに種々の抗原に対する免疫応答の惹起にとって有用である。組成物は、上述の通りに予防的または治療的に使用され得るだけでなく、抗体、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方（例えば診断目的の）の調製、ならびに所定の抗原の免疫精製のために使用され得る。ポリクローナル抗体が所望される場合に選択される動物（例えばマウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど）は、本発明の組成物を用いて免疫化され得る。通常、動物は、２～６週間後に、１回以上の抗原の投与をともなって追加免疫される。それから、ポリクローナル抗血清が免疫化した動物から入手され得、公知の手法にしたがって使用され得る（例えば、Jurgens et al., J. Chrom. 1985, 348:363-370を参照すればよい）。

【０２８７】

いくつかの実施形態において本発明は、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物を含んでいるキットを提供する。いくつかの実施形態において、上記キットは上記組成物を投与するための装置をさらに提供する。本発明は上記キットに含まれている装置の種類によって限定されない。いくつかの実施形態において、上記装置は、本発明の組成物の経鼻適用を目的として構成されている（例えば、経鼻塗布器（例えばシリンジ）、経鼻吸入器または経鼻噴霧器）。いくつかの実施形態において、キットは、ＮＥおよび免疫原を含んでいる組成物を、濃縮された形態（例えば、対象への投与前に希釈され得る）において含んでいる。

【０２８８】

いくつかの実施形態において、キットの構成要素のすべては、単一の容器（例えば、バイアルまたはチューブ）のなかに存在している。いくつかの実施形態において、キットの構成要素のそれぞれは、単一の容器（例えば、バイアルまたはチューブ）に配置されている。いくつかの実施形態において、キットの構成要素の１つ以上は、単一の容器（例えば、バイアルまたはチューブ）に配置されており、同じキットの他の構成要素は、別の容器（例えば、バイアルまたはチューブ）に配置されている。いくつかの実施形態においてキットは緩衝液を含んでいる。いくつかの実施形態において、キットは使用のための取扱説明書をさらに含んでいる。

【０２８９】

〔実施例〕

以下の実施例は、本発明のある好ましい実施形態および局面を説明するものであり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【０２９０】

以下の実験開示において、以下の省略を適用する：ｅｑ（当量）；μ（ミクロン）；Ｍ（モル濃度）；μＭ（マイクロモル濃度）；ｍＭ（ミリモル濃度）；Ｎ（規定）；ｍｏｌ

（モル）；ｍｍｏｌ（ミリモル）；μｍｏｌ（マイクロモル）；ｎｍｏｌ（ナノモル）；ｇ（グラム）；ｍｇ（ミリグラム）；μｇ（マイクログラム）；ｎｇ（ナノグラム）；Ｌ（リットル）；ｍｌ（ミリリットル）；μｌ（マイクロリットル）；ｃｍ（センチメートル）；ｍｍ（ミリメートル）；μｍ（マイクロメートル）；ｎＭ（ナノモル濃度）；℃（度摂氏）；およびＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水）。

【０２９１】

（実施例１：不活性化されている呼吸器合胞体ウイルスのナノエマルションを含んでいる組成物、およびそれを利用した方法）

材料と方法

マウス。Ｂａｌｂ／ｃマウスをジャクソン研究所から購入した。動物の使用および取扱いにおけるミシガン大学の委員会の指針に従って、すべての動物実験を行った。

【０２９２】

ウイルスプラーク試験。感染マウス由来の右肺葉を採取し、すり鉢およびすり棒を用いて砂と共にすり潰した。肺由来の試料を２回脱水乾燥するか、またはナノエマルションと共にインキュベートした後、上清を～９０％のコンフルエントな単層のベロ細胞上に続けて希釈した。試料をゆっくり回転させながら３７℃において２時間インキュベートし、次いで、感染した上清を除去し、０．９％のメチルセルロースと置換した。３７℃において５日間インキュベーションした後、メチルセルロースを除去し、メタノールと置換し、－８０℃において１時間インキュベートした。メタノールを除去した後、プラークが発達するまで試料を－８０℃において保存した。改変したＥＬＩＳＡのプロトコールを用いて、プラークを発達させた。要約すると、２５％のブロット（リン酸緩衝化生理食塩水に希釈した粉ミルク）を用いて３７℃において１時間細胞をブロックし、洗浄して、ヤギ抗ヒトＲＳＶポリクローナルＡｂ（Chemicon International）と共に３７℃において１時間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼを結合させた抗ヤギ／ヒツジＩｇＧ（Serotec）と共に１時間インキュベートした。細胞を洗浄し、クロロナフトールと共に室温においてインキュベートし、プラークを数えた。

【０２９３】

ＲＳＶナノエマルションの用意。ＲＳＶ（ＲＳＶ株系統１９（例えば、Lukacs et al., Immunopathology and Infection, 169, 977-986 (2006)を参照）（2×10^{6}ｐｆｕ）を、１５％のW_{80}５ＥＣナノエマルションと共に６０分間（ウイルスを完全に不活性化するために本発明の実施形態を開発する間に行った実験において決定した時間）インキュベートした。ＲＳＶワクチンの用意は、免疫化のそれぞれについて新しく行った。各動物について、０日目および２８日目に、１０μｌのエマルションまたはエマルション＋ＲＳＶを、左鼻孔に接種した。これは、ワクチン接種／マウスあたり、合わせて1×10^{4}ｐｆｕを用いたことを意味した。

【０２９４】

気管支肺胞洗浄サイトカイン測定。気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を１ｍｌの無菌のＰＢＳを用いて感染マウスに対して行った。細胞懸濁液を遠心し、上清をサイトカイン測定のために回収し、R&D systemsから購入したキットを用いたBioplexによって測定した。

【０２９５】

肺の分散およびインビトロにおけるＲＳＶの抗原再投与。肺を、１ｍｌのＰＢＳ－ＥＤＴＡによる洗浄後に除去し、循環式の水槽（３７℃）中において４５分間、コラーゲナーゼ（０．２％、タイプＩＶ、Sigma製）によって分散させた。次いで、分散した細胞を数えた。次いで、単一細胞の懸濁液を2×10^{6}／ｍｌの濃度において播種し、ＲＳＶ（ＭＯＩ－０．５）と共にインキュベートした。細胞遊離上清を３６時間後に回収し、産生されたサイトカインのレベルをBioplexによって測定した。この測定は、ワクチン接種していないマウス群と比較した、ワクチン接種したマウス群の肺における全体的な反応を測定できるものであった。

【０２９６】

（実施例２：ナノエマルションは、ＲＳＶを実質的に不活性化させる）

エマルションのＲＳＶを不活性化する能力を試験するために、ＲＳＶ（10^6粒子形成ユニット（ＰＦＵ）を様々な濃度（０％～２０％）におけるナノエマルションと共に様々な時間（１時間～３時間）インキュベートした（図１参照）。ベロ細胞を用いたプラーク試験によって、感染ウイルスの数を決定した。サブコンフルエントなベロ細胞を感染させるために、ナノエマルションによってインキュベートしたウイルスを用いた。ＲＳＶプラークを免疫組織化学的な技法を用いて可視化した。標準的なプラーク試験によって評価したところ、３時間インキュベートしたわずか１％濃度のナノエマルションにおいて、活性のあるウイルスは検出されなかった（図１参照）。したがって、本発明は、ナノエマルションの濃度が、２％ときわずか１時間、または１％のとき３時間において、ＲＳＶを完全に死滅させるのに有効であることを提供する。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、ＲＳＶの感染性を減少させることおよび／または完全に不活性化することにおいて効果的であるナノエマルションを提供する。

【０２９７】

（実施例３：ナノエマルションによる免疫化は、ＲＳＶ抗原投与による免疫を促進させる）

次いで、ナノエマルションがウイルス感染に対する感染防御に重要な免疫応答を誘導するための免疫促進剤として用いられ得るか否かを決定した。この局面を決定するため、免疫化のプロトコールを、０日目において、ナノエマルションによって不活性化されたウイルス（ナノエマルション（１５％）－ＲＳＶ混合物（計１０μｌ、５μｌ／鼻孔））による鼻腔内の感作によって動物を免疫化し、２８日目において増強することからなって、または対照群としてＲＳＶを含んでいないナノエマルション単独による鼻腔内の感作によって動物を免疫化することからなって利用した。次いで、５６日目（８週目）において、動物に生存している感染性ＲＳＶを抗原投与し、防御免疫の証拠について評価した。第１の目的は、免疫化のプロトコールの間にＲＳＶ特異的な抗体の産生をモニタリングすることである。血清中のＲＳＶ特異的な抗体の相関的な力価を、ＲＳＶタンパク質抽出物に対する酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）によって決定した。（ＲＳＶの抗原投与の時間における）０日目、１週目、４週目および８週目を含んでいる免疫化後の特定の時点において血液を採って血清を収集し、ＲＳＶに特異的な全血清ＩｇＧを評価した。図２に示すように、抗ＲＳＶ　ＩｇＧの力価は、免疫化後１週目においては検出できず、４週間目（増強前）には増加しており、最初の免疫化後８週目までに顕著に増加した。したがって、本発明は、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶによる対象の免疫化（例えば、鼻腔内への免疫化）が対象において抗ＲＳＶ免疫応答を誘導することを提供する。いくつかの実施形態において、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶの、対象に対する投与後４週間以内にその対象において抗ＲＳＶ免疫応答が誘導される。いくつかの実施形態において、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶの、対象に対する二回目の投与（例えば、「増強的な」投与）によって、その対象において抗ＲＳＶ免疫応答が誘導される。いくつかの実施形態において、本発明は、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶを含んでいる組成物であって、その組成物を投与された対象において抗ＲＳＶ免疫応答を生じさせるのに役立つ組成物を提供する。

【０２９８】

（実施例４：ＲＳＶ－ナノエマルションによる免疫化は、細胞傷害性のＴｈ１型抗ウイルス性免疫応答を誘導する）

次いで、ＲＳＶに対するワクチンの他の型に関連する種々の問題（例えば、ホルマリンによって不活性化されたＲＳＶの、対象に対する投与後の感染における重篤な疾患の発生）に起因して、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶの、対象に対する投与において、任意の種類の免疫応答が発生するのかを決定した。

【０２９９】

ＮＥ－ＲＳＶの投与は、ＲＳＶを抗原投与したマウスの気道からのＢＡＬ液における抗ウイルス性のサイトカインを増加させた。１ｍｌのＰＢＳによる気道の洗浄を利用し、抗原投与後８日目（Ｔ細胞サイトカインがピークに達する時）における肺からのＢＡＬ液（

Bioplex、R&D systems）の複合的な分析によって、肺におけるサイトカインのレベルを決定した。

【０３００】

図３に示すように、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶを投与（例えば、経鼻）した対象は、対照のナノエマルション免疫化群を比較して、Ｍ２ペプチド特異的細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞の数の増加を示した。Ｍ８２－９０の免疫優性ペプチドに対するＴＣＲを特異的に認識する特異的ＭＨＣクラスＩ四量体を用いて、酵素学的に分散した、抗原投与後４日目における肺のフローサイトメトリー解析によって、ＲＳＶＭ８２－９０特異的ＣＤ８　Ｔ細胞の数を決定した。さらに、ＢＡＬ液を用いた、気道における抗ウイルス環境の評価は、ウイルスの抗原投与段階の間における、対象におけるＩＦＮ－γおよびＩＬ－１７の産生の増加を示したが、病原性Ｔｈ２サイトカイン、ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３における増加を示さなかった（図４参照）。上述のように、Ｔｈ２型サイトカインは、ホルマリンによって不活性化されたＲＳＶを用いて行われた従前のワクチン試験において、原因となる役割を有していると確認された。さらに、Ｔｈ２サイトカインインターロイキン－１３（ＩＬ－１３）は、肺の粘液分泌の伝達物質であり（Hershey, G. K. 2003. J. Allergy Clin. Immunol. 111:677-690、Walter et al., 2001 J. Immunol. 167:4668-4675；Zhu et al., 1999 J. Clin. Investig. 103:779-788を参照）、ＩＬ－１３を発現しているＲＳＶ特異的Ｔ細胞はＲＳＶ細気管支炎においてみられる（deWaal, 2003 J. Med. Virol. 70:309-318）。したがって、いくつかの実施形態において、本発明はＮＥ不活性化ＲＳＶを含んでいる免疫原性組成物および粘液の産生、気道狭窄、気道過敏症、空気トラッピング、ヒポキシア（hpoxia）および／または部分的な肺虚脱（例えば、Ｔｈ２型サイトカイン（例えばＩＬ－１３）の発現の促進に起因する）を促進することなく対象においてＲＳＶに対する免疫応答を生じさせるために、当該免疫原性組成物を用いる方法を提供する。

【０３０１】

ＮＥ－ＲＳＶを投与した対象におけるサイトカイン反応をさらに評価するために、感染していない動物、またはワクチン接種して抗原投与した動物の一方から肺を単離し、ワクチン接種せずにＲＳＶを抗原投与した動物と比較した。肺を除去し、単一細胞の懸濁物へとコラーゲナーゼによって分散し、続いてインビトロにおいてウイルスを抗原再投与した。肺の全サイトカインを非感染の対照（ＵＣ）、ワクチン接種して抗原投与した（ワクチン）、またはＲＳＶを抗原投与した対照（非ワクチン接種）のマウスの肺から単離した。細胞を２×１０^{6}／ｍｌの濃度において、生きたＲＳＶ（ＭＯＩ＝０．５）の存在下、３６時間培養した。バイオプレックスマルチプレックスアッセイによって、上清においてサイトカインの濃度を測定した。

【０３０２】

ＩＬ－１７の産生は再度顕著に上方制御され、ＩＦＮは増加したが、Ｔｈ２サイトカインＩＬ－４は変化しなかったことが観察された（図５参照）。したがって、本発明は、ＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種がさらなる病原性反応（例えば、ホルマリンによって不活性化されたＲＳＶによって得られた結果と比較した場合）にマウスを予め敏感にしないことを提供する。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、ＩＦＮ－γおよびＩＬ－１７における増加が、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶの免疫化のプロトコールよって誘導された、より抗ウイルス的な免疫環境をもたらす。

【０３０３】

任意の免疫化のプロトコルの結果に対しても重要なことは、免疫化および生きたウイルスに対するばくろ後のウイルス排除における増強があるか否かを決定することである。１５％ＮＥ中の１０^{6}ＰＦＵのＲＳＶ（ＮＥ－ＲＳＶ）、または対照として１５％ＮＥ単独（ＮＥ）によって、４週間隔てて２回、鼻腔内を通じてマウスを免疫化した。次いで、２回目のワクチン接種の後マウスを４週間抗原投与し（合わせて８週間）、右肺のプラーク試験によって、生きたウイルス粒子の数を決定した。ワクチン接種し続いてウイルスを感

染させた対象の肺に存在する生きたウイルスの数を決定するためにプラーク試験によって対象を評価した際、ナノエマルション－ＲＳＶによって免疫化した対象は、免疫化していない対象と比較して、排除性の顕著な増加（ウイルスプラークの減少）を示した（図６参照）。したがって、本発明は、ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶ（ＮＥ－ＲＳＶ）の投与が対象における感染防御反応を確立することを提供する。

【０３０４】

（実施例５：ＲＳＶ－ナノエマルションによる免疫化およびアレルギー性喘息）

疫学研究では、先に起こる重度のＲＳＶ感染症とその後起こるアレルギー性喘息の発達との関連性を示してきた。したがって、ＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種、続く生きたウイルスの抗原投与が、その後に起こるアレルギー性喘息のモデルに対する反応に影響し得るか否かを決定するために、マウスをＮＥ－ＲＳＶによって２回ワクチン接種し、10^5 ＰＦＵのＲＳＶを鼻腔内に抗原投与し、ゴキブリアレルゲンに対して感作させた。このモデルにおいて、ＲＳＶの抗原投与後２１日目に、不完全フロイントアジュバンド中に乳化させた臨床学的皮膚テストのグレードのゴキブリアレルゲン（１００μｇ）をマウスの腹腔内／皮下へ投与する。次いで、マウスに１４日後に１回の鼻腔内への抗原投与（１５μｇ）を受けさせ、鼻腔内への抗原投与から５日後および７日後に２回の腹腔内への抗原投与（４０μｇ）を受けさせた。最後の腹腔内への抗原投与から２４時間後にアレルギー性疾患についてマウスを評価した。

【０３０５】

アレルギー性肺疾患の特徴の１つは粘液の過剰分泌である。肺組織切片の過ヨウ素酸シッフ（ＰＡＳ）染色によって評価したところ、ＮＥ－ＲＳＶによってワクチン接種したマウスは、ワクチン接種していないマウスと比較して、アレルゲンによって誘導される粘膜反応の低下を示した（図８参照）。同様に肺の全ＲＮＡにおける粘液遺伝子Ｇｏｂ５の発現の低下を示した（図７および８参照）。ＱＰＣＲによって評価したところ、ウイルス抗原投与単独と同様に、アレルゲンを抗原投与し、ＮＥ－ＲＳＶによってワクチン接種した動物は、肺におけるＩＬ－１７の顕著に高まった誘導を有していた（図９Ａ参照）。Ｔｈ２サイトカインはアレルギー性肺疾患の促進に重要である。ＮＥ－ＲＳＶによってワクチン接種したマウスは、ＩＬ－４（ホモジェナイズされた肺およびＢＡＬ）およびＩＬ－５（肺）を包含するＴｈ２サイトカインの産生の減少を示した（図９Ｂ参照）。さらに、ＩＬ－１３のｍＲＮＡの減少傾向がみられた。ＮＥ－ＲＳＶによってワクチン接種した動物においてアレルギー性疾患の促進はみられなかった。さらに、ワクチン接種したマウスは、代わりに活性化されたマクロファージマーカーＦｉｚｚ－１の発現が顕著に低下した。代わりに活性化されたマクロファージは、繊維症（fibrotic disease）だけでなく、Ｔｈ２反応にも関連する。機序の理解は本発明の実施に必須ではなく、本発明は任意の特定の作用機序に限定されないが、いくつかの実施形態において、Ｆｉｚｚ－１における減少はワクチン接種したマウスにおけるＴｈ２サイトカインの減少という結果をもたらし、また、ＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種がその後のアレルギー性肺疾患の発達に対して防御する機序を提供する。

【０３０６】

（実施例６：ＲＳＶ－ナノエマルションによる免疫化は、ＲＳＶ特異的な抗体の産生を誘導する）

ＮＥ／ＲＳＶによるマウスの鼻腔内へのワクチン接種は、ＲＳＶ特異的な抗体の産生をもたらす。ＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種がＮＥ－ＲＳＶ組成物を投与した対象における抗体反応（例えば、ウイルス感染に対する防御に包含される）を促進するか否かを決定するために、本発明の実施形態を開発する間に実験を行った。免疫化のプロトコールは、鼻腔内へのＮＥ－ＲＳＶの投与を２回（２８日隔てた）行ってワクチン接種したマウスに関して利用した。０日目および２８日目において、10^5 ウイルス粒子の系統１９を含んでいるＮＥ／ＲＳＶによってマウスを免疫化した。５５日目に、精製したＲＳＶタンパク質抽出物を用いたＥＬＩＳＡによって、血清中の全ＲＳＶ特異的な抗体のレベルをおいて決定した。図１０に示すように、顕著なＲＳＶ特異的反応がＮＥ－ＲＳＶによるワクチン

接種後に全身に生じた（例えば図１０Ａを参照）。これらは、ＲＳＶ特異的ＩｇＥの力価における促進を伴わない全ＲＳＶ特異的Ｉｇの劇的な誘導を含んでいた（例えば図１０Ａを参照）。

【０３０７】

また、ワクチン接種が肺においてＲＳＶ特異的な抗体の誘導を局所的に促進するか否かを決定するために、本発明の実施形態を開発する間に実験を行った。生きたＲＳＶ（10^5）の腹腔内への抗原投与後２日目における気管支肺胞洗浄試料（ＢＡＬ）のＥＬＩＳＡによって、ＲＳＶ特異的な全ＩｇおよびＩｇＡの存在を評価した。特には、５５日目において精製したＲＳＶタンパク質抽出物を用いたＥＬＩＳＡによって、血清中の全ＲＳＶ特異的な抗体のレベルを決定した。血清から測定した全Ｉｇを、１：１６００に希釈した試料において評価し、他の試料を１：５０において評価した。（Ｂ）

図１０Ｂに示すように、対照のワクチン接種していないマウス（未処置Ｃｔｒｌ）およびＮＥ－ＲＳＶの初回の抗原投与を受けているマウス（初回ＲＳＶ）と比較して、ＮＥ－ＲＳＶの鼻腔内への投与を２８日隔てて２回受けているワクチン接種したマウス（ＮＥ－ＲＳＶ）は、生きたウイルスの抗原投与後２日目における気管支肺胞洗浄液中のＲＳＶ特異的なＩｇＡおよびＲＳＶ特異的な全Ｉｇの増加を示した（例えば、図１０Ｂを参照）。これらのデータは、ＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種が顕著なＲＳＶ特異的な抗体を誘導し、生きたウイルスの抗原投与におけるＲＳＶ特異的な抗体の局所的な誘導を促進することを証明している。

【０３０８】

以上の明細書に記載されているすべての公開及び特許が、参照によって本明細書に援用される。記載されている本発明の組成物および方法の種々の変更及び変形が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者にとって明白であろう。本発明が特定の好適な具体例を伴って記載されているが、請求されている本発明がこのような特定の具体例に不当に限定されないことを理解すべきである。実際に、関連する分野における当業者にとって明白である、本発明を実施するための、記載されている形態の種々の変更は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０３０９】

【図１】ナノエマルションによる呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）の死滅を示す図である。

【図２】ナノエマルションによって不活性化されたＲＳＶ（ＮＥ－ＲＳＶ）による免疫化後のＲＳＶ特異的な抗体の誘導を示す図である。

【図３】対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、ＲＳＶ特異的なＣＤ８Ｔ細胞反応の促進をもたらすことを示す図である。

【図４】対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、ＲＳＶを抗原投与したマウスの気道からのＢＡＬ液における抗ウイルス性のサイトカインを促進することを示す図である。

【図５】ＮＥ－ＲＳＶによるマウスのワクチン接種が、生きたＲＳＶの抗原投与後の肺におけるＩＬ－１７の産生を促進することを示す図である。

【図６】対象に対するＮＥ－ＲＳＶの投与が、排除を向上させ、その後の生きたウイルスの抗原投与における防御応答を誘導することを示す図である。

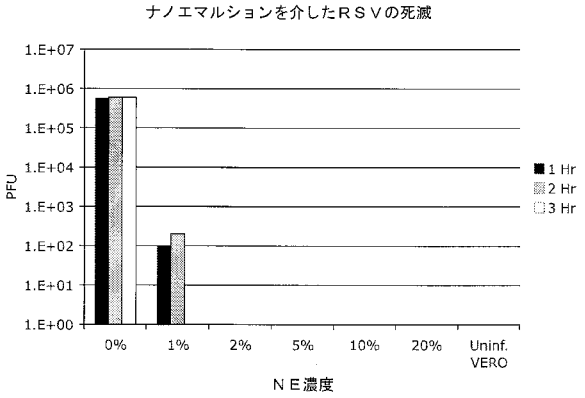
【図７】対照のマウスと比較した、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおける種々の遺伝子の発現を示す図である。

【図８】対照のマウスと比較した、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおける肺組織切片の過ヨウ素酸シッフ（ＰＡＳ）染色を示す図である。

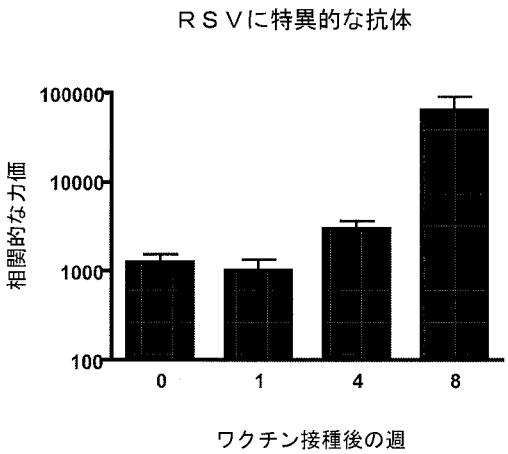
【図９】対照のマウス対する、ＮＥ－ＲＳＶを投与したマウスにおけるサイトカインの発現を示す図である。

【図１０】顕著なＲＳＶ特異的な抗体反応がＮＥ－ＲＳＶによるワクチン接種後に全身に生じたこと（Ａ）、および生きたウイルスの抗原投与後２日目における、ワクチン接種したマウスの気管支肺胞洗浄液中の全Ｉｇを示す図である。

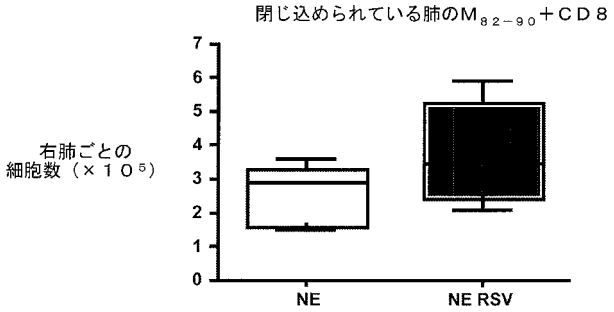
【図１】



【図２】

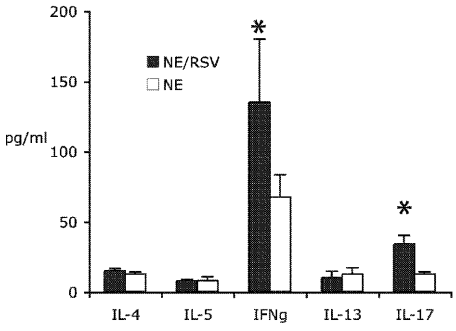


【図３】

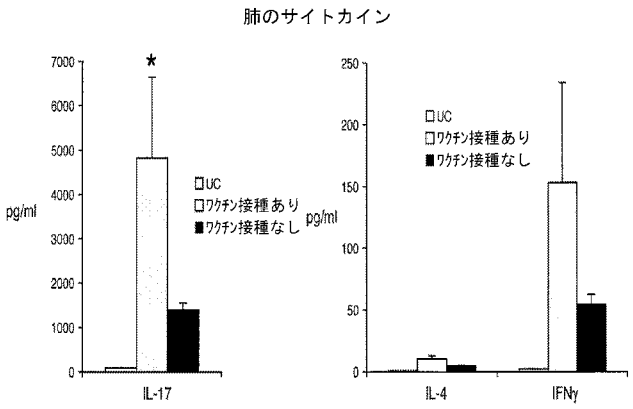


【図４】

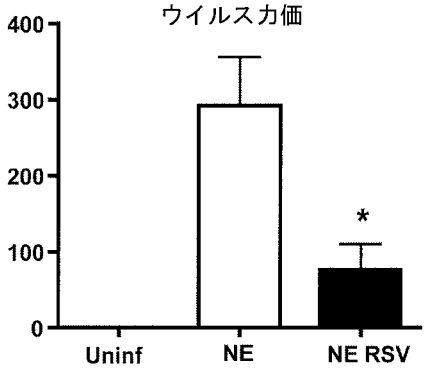
FIGURE 4



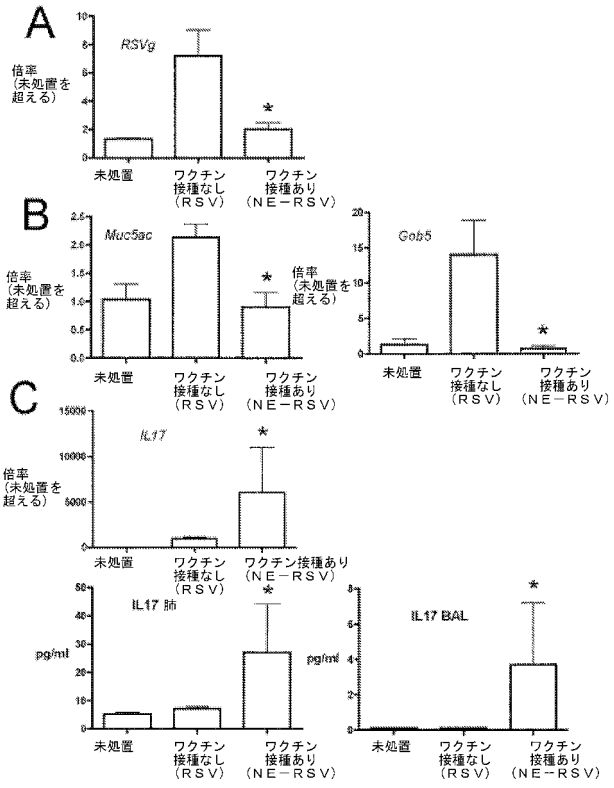
【図５】



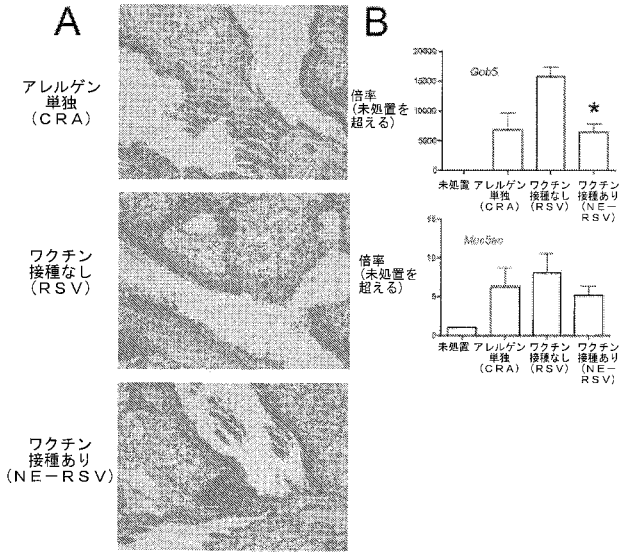
【図６】



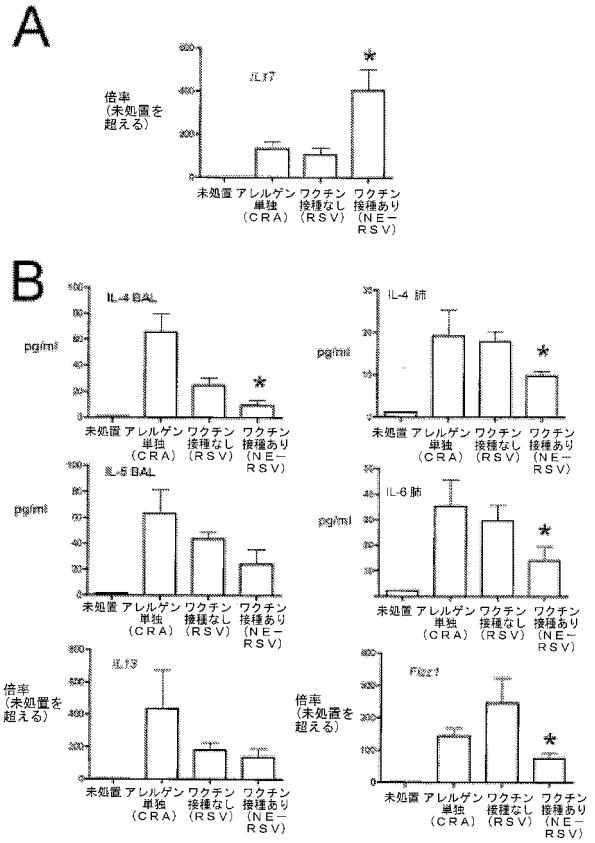
【図７】



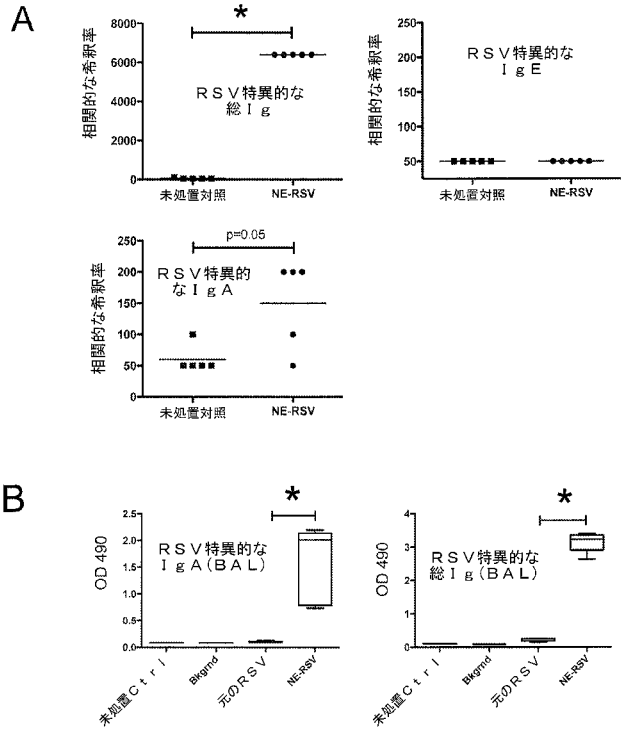
【図８】


A
アレルゲン単独（ＣＲＡ）
ワクチン接種なし（ＲＳＶ）
ワクチン接種あり（ＮＥ－ＲＳＶ）
B
Gob5
MucSac
倍率（未処置を超える）
未処置
アレルゲン単独（CRA）
ワクチン接種なし（RSV）
ワクチン接種あり（NE－RSV）

【図９】


A
IL17
倍率（未処置を超える）
B
IL-4 BAL
IL-4 肺
IL-5 BAL
IL-6 肺
IL13
Fizz1
pg/ml
未処置
アレルゲン単独（CRA）
ワクチン接種なし（RSV）
ワクチン接種あり（NE－RSV）

【図１０】


A
相関的な希釈率
ＲＳＶ特異的な総Ｉｇ
ＲＳＶ特異的なＩｇＥ
ＲＳＶ特異的なＩｇＡ
p=0.05
未処置対照
NE-RSV
B
OD 490
ＲＳＶ特異的なＩｇＡ（ＢＡＬ）
ＲＳＶ特異的な総Ｉｇ（ＢＡＬ）
未処置Ｃｔｒｌ
Bkgrnd
元のＲＳＶ
NE-RSV

【手続補正書】
【提出日】平成24年2月17日(2012.2.17)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
不活性化された呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）のナノエマルションを含んでいる、免疫原性組成物。
【請求項２】
上記呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）を不活性化するために使用される上記ナノエマルションは、ポリソルベート界面活性剤、エタノール、塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、オイルおよび水を含んでいる、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
１．０％～１０％、５％～１５％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％または５０％～６０％のナノエマルションの溶液を含んでいる、請求項１または２に記載の免疫原性組成物。
【請求項４】
１０～10^{10}、10^{2}、10^{3}、10^{4}、10^{5}、10^{6}、10^{7}、10^{8}または10^{9}のプラーク形成ユニット（ＰＦＵ）の不活性化された呼吸器合胞体ウイルスを含んでいる、請求項１～３のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項５】
熱安定性である、請求項１～４のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項６】
薬学的に受容可能な担体をさらに含んでいる、請求項１～５のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項７】
免疫賦活剤をさらに含んでいる、請求項１～６のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の免疫原性組成物を含んでいる、ワクチン。
【請求項９】
粘膜表面に対する投与のために調合されている、請求項８に記載のワクチン。
【請求項１０】
呼吸器合胞体ウイルス感染の処置または予防のためのワクチンの製造における、請求項１～７のいずれか１項に記載の免疫原性組成物の、使用。
【請求項１１】
呼吸器合胞体ウイルス感染の処置または予防に使用されるための、請求項１～７のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１２】
呼吸器合胞体ウイルスの予防または処置に使用するための抗体を製造する方法であって、
請求項８に記載のワクチンを用いて受容物を免疫化する工程、および上記受容物から抗体を単離する工程を包含している、方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/38854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/155 (2010.01)
USPC - 424/211.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC-424/211.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 424/184.1, 204.1, 277.1; 530/350; 536/53 (see search terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar
vaccine, emulsion, nanoemulsion, inactivat$, virus, respiratory, syncytial, systemic, mucosal, interferon, interleukin, IgG, W805ec, Th-1,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P/X	US 2009/0291095 A1 (BAKER JR. et al.) 26 November 2009 (26.11.2009) para [0007]-[0012], [0119]	1-27
Y	US 2006/0257426 A1 (BAKER et al.) 16 November 2006 (16.11.2006) para [0006]-[0009], [0022], [0029], [0030]-[0031], [0088], [0180], [0208], [0311]-[0312], [0328], [0334], [0376], [0539]	1-27
Y	US 2005/0079185 A1 (PARISOT et al.) 14 April 2005 (14.04.2005) para [0007]-[0009], [0099]	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 July 2010 (23.07.2010)	23 AUG 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リンデル, デニス エム.
アメリカ合衆国, ４８１９７ ミシガン州, イプシランティ, アップルウッド ドライブ ５２５０
(72)発明者 ベイカー, ジュニア. , ジェームズ アール.
アメリカ合衆国, ４８１０３ ミシガン州, アナーバー, ホールデン ドライブ ３９９７

Ｆターム(参考) 4C076 AA17 BB03 CC06
4C084 AA19 MA02 NA01 NA05 ZB091
4C085 AA03 BA57 CC08 DD23